Ф. К. Черкес

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Медицина · 1974

К ПРА

ПО

(с элементам

«Допущено Главны
ний Министерства
ве руководства к
щихся фельдшерск

Ф. К. ЧЕРКЕС

РУКОВОДСТВО

К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

(с элементами программированного обучения)

«Допущено Главным управлением учебных заведений Министерства здравоохранения СССР в качестве руководства к практическим занятиям для учащихся фельдшерско-лаборантских отделений медицинских училищ»

Вадим Иосифович
ВРАЧ
СТЫЦЮК

МОСКВА · «МЕДИЦИНА» · 1974

УДК 576.8.083(024) : 61 (076.5)

Пособие содержит необходимые сведения об основных методах общей и частной микробиологии.

Большое внимание уделено морфологии и классификации микробов, приготовлению красок и методам окраски, приготовлению питательных сред. Приводятся основные методы исследования при изучении гноеродной группы кокков, возбудителей кишечных инфекций, возбудителей дифтерии и коклюша.

Пособие написано в соответствии с программой, утвержденной Министерством здравоохранения СССР, и предназначено для учащихся фельдшерско-лаборантских отделений медицинских училищ.

Ч $\frac{51000-313}{039(01)-74}$ 29—74

© Издательство «Медицина» Москва. 1974

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1. Бактериологическая лаборатория. *Садыков А. И., Черкес Ф. К.* 3
Глава 2. Классификация микроорганизмов и методы изучения их морфологии. *Фадеева Г. В.* 9
Глава 3. Стерилизация. *Бельская Н. А.* 28
Глава 4. Микробиологические методы исследования. *Кац Г. И.* 43
Глава 5. Серологические методы исследования (реакции иммунитета). *Кац Г. И.* 69
Глава 6. Биологические методы исследования (работа с животными). *Черкес Ф. К.* 95

ЧАСТЬ II. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Патогенные кокки

Глава 7. Стафилококки. *Черкес Ф. К.* 115
Глава 8. Стрептококки. *Черкес Ф. К.* 126
Глава 9. Пневмококки. *Черкес Ф. К.* 135
Глава 10. Менингококки. *Черкес Ф. К.* 144
Глава 11. Гонококки. *Черкес Ф. К.* 154

Возбудители кишечных инфекций

Глава 12. Энтеропатогенные серотипы кишечных палочек. *Черкес Ф. К.* 161
Глава 13. Сальмонеллы. *Черкес Ф. К.* 171
Глава 14. Шигеллы. *Черкес Ф. К.* 190
Глава 15. Возбудители коклюша и паракоклюша. *Черкес Ф. К., Шерстинская С. М.* 201
Глава 16. Возбудители дифтерии. *Черкес Ф. К., Шерстинская С. М.* 210

Часть I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава I. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

Цель занятия: ознакомить учащихся с назначением, оборудованием и режимом работы бактериологической лаборатории.

Бактериологическая лаборатория — учреждение, выполняющее различные микробиологические исследования: бактериологические, иммунологические и др. Такие лаборатории могут быть организованы при лечебно-профилактических учреждениях; санитарно-эпидемиологических станциях; научно-исследовательских институтах.

В бактериологических лабораториях проводят анализы с различной целью: диагностические, профилактические, по эпидемическим показаниям.

Материалом для исследования служат выделения из организма человека: испражнения, моча, кровь, мокрота, гной, спинномозговая жидкость, а также трупный материал, объекты внешней среды (вода, воздух, почва), пищевые продукты, смывы с различных предметов и т. д.

ПОМЕЩЕНИЕ И ОБОРУДОВАНИЕ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Помещение, предназначенное для бактериологической лаборатории, должно быть изолированным и иметь лабораторную комнату, бокс с предбоксником, моечную, средоварню, автоклавную (комнату для стерилизации), материальную комнату.

Кроме того, при лаборатории должно быть специальное помещение для содержания подопытных животных — виварий.

Лабораторная комната служит для проведения бактериологических исследований. Она должна быть просторной, хорошо освещена, подвергаться влажной уборке и дезинфекции.

В лаборатории должен быть проведен водопровод, должно иметься не менее двух раковин; из приборов необходимы термостат, холодильник, микроскопы, лупы, фильтровальные установки и т. п.

Бокс с предбоксником — изолированное помещение, где проводят работу в асептических условиях. С целью уменьшения движения воздуха двери в боксе и предбоксе должны быть раздвижными на роликах и закрываться герметически. Стол в боксе должен иметь легко дезинфицируемую поверхность (линолеум, пластик). На столе размещают горелку, спички, цинковый или эмалированный лоток, банку с дезинфицирующим (обеззараживающим) раствором, баночку с ватой.

Перед работой пустой бокс подвергают облучению бактерицидными (ультрафиолетовыми) лампами в течение 20—30 минут. Лампы устанавливают на расстоянии 2—2,5 м от поверхности пола.

При отсутствии таких ламп производят пропаривание бокса: в открытом сосуде в помещении бокса кипятят воду в течение 1—2 часов. Пар наполняет бокс, конденсируется и, осаждаясь, захватывает взвешенные в воздухе частицы, в том числе и микроорганизмы. Работу в боксе можно начинать через несколько часов после окончания пропаривания.

Перед работой следует приготовить и разложить на эмалированном лотке все необходимое для работы, так как во время работы входить и выходить из бокса воспрещается. В предбокснике надевают стерильный халат, шапочку и маску.

После окончания работы стены и пол в боксе протирают 3% раствором карболовой кислоты и облучают бактерицидными лампами в течение 20—30 минут.

Средоварня — помещение, где готовят и разливают питательные среды. В этой же комнате в шкафах хранят необходимую стерильную посуду: пробирки (бактериологические, агглютинационные и т. п.), колбы, стаканы, банки, цилиндры, пипетки градуированные, пастеровские и моровские, чашки Петри и пр., а также некоторые химикаты.

Моечная — комната, специально оборудованная для обработки и подготовки посуды для стерилизации. В этой комнате должно быть не менее двух раковин, водопроводные краны для горячей и холодной воды, стеллажи для посуды.

Для обработки посуды используют моющие средства: мыло, порошки, горчицу, ерши различных размеров и пр. В моечной хранят эмалированные тазы, оцинкованные ведра, кислотоустойчивые бачки, пеналы для пипеток и

большие стеклянные сосуды для обработки (обеззараживания) посуды в кислоте.

Автоклавная, или стерилизационная комната, должна быть изолирована от других помещений и оснащена аппаратами для обеззараживания и стерилизации: автоклавом, печью Пастера, сушильным шкафом, стерилизатором и т. п. Стерилизации подвергают питательные среды, посуду, спецодежду и инструменты. Обеззараживанию подлежит отработанный инфицированный материал.

Материальная — комната для хранения питательных сред, реактивов, приборов и аппаратуры. Она оборудована стеллажами и шкафами.

Во всех помещениях бактериологической лаборатории полы должны быть покрыты линолеумом или пластиком, стены и потолки окрашены светлой масляной краской.

ОБОРУДОВАНИЕ РАБОЧЕГО МЕСТА

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь постоянное рабочее место. Рабочие столы и стулья в лабораторной комнате должны легко дезинфицироваться, для этого стол покрывают линолеумом или пластиком; стулья — металлические вертушки.

Стол обеспечивают достаточным освещением — естественным или искусственным. На рабочей поверхности стола должно быть не менее 300 лк при люминесцентных лампах и не менее 150 лк при лампах накаливания. Для работы с микроскопом нужно иметь специальные осветители.

На столе следует держать предметы первой необходимости: бактериологическую петлю, пинцет, банку с дезинфицирующей жидкостью, банку с ватой, газовую или спиртовую горелку и т. д. Другие нужные в процессе работы предметы должны находиться в ящиках стола или шкафах.

По окончании работы рабочее место приводят в порядок, а стол дезинфицируют.

Ежедневно помещение бактериологической лаборатории убирают влажным способом.

Контрольные вопросы

1. Назначение бактериологической лаборатории.
2. Какие помещения входят в состав бактериологической лаборатории?

3. Какой аппаратурой и какими приборами должна быть оснащена бактериологическая лаборатория?

4. Как обрабатывают бокс до начала и после окончания работы?

5. Каким способом следует производить уборку в бактериологической лаборатории?

З а д а н и е. Заполните форму № 1, указав назначение каждого помещения в бактериологической лаборатории.

Ф о р м а № 1

Лабораторная комната	Бокс с предбоксником	Моечная	Средоварня	Материальная комната

ПРАВИЛА ПОВЕДЕНИЯ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОБРАЩЕНИЯ С ИНФИЦИРОВАННЫМ МАТЕРИАЛОМ

Постоянное соприкосновение с инфицированным материалом: выделениями больных, культурами микроорганизмов, зараженными животными и т. д. — создает опасность заражения сотрудников лаборатории. С другой стороны, необходимо обеспечить стерильность при работе для сохранения чистоты культур.

Для предупреждения заражения, т. е. возникновения внутрилабораторных заболеваний, и соблюдения стерильности при работе каждый сотрудник должен:

1) познакомиться с «Правилами поведения и работы в бактериологической лаборатории»;

2) в помещении лаборатории быть в спецодежде — халате, шапочке или косынке;

3) не выходить за пределы лаборатории в спецодежде и не надевать на нее верхнее платье;

4) не переходить без необходимости в другие помещения и не переносить инфицированный материал: живые культуры бактерий, зараженных животных и т. п.;

5) присланный в лабораторию для исследования материал должен рассматриваться как инфицированный, поэтому поверхность посуды, в которой материал передан в лабораторию, следует обтирать дезинфицирующим раствором;

6) переносить инфицированный материал из одного сосуда в другой над цинковой или эмалированной кюветой, в которую налита дезинфицирующая жидкость;

7) есть, пить и курить разрешается только в специально выделенном помещении;

8) при необходимости отсоса инфекционного материала используют резиновые баллоны или резиновую трубку (шланг), соединенные с пипеткой;

9) при нарушении целости сосуда, содержащего инфицированный материал, необходимо тщательно обработать (обеззаразить) загрязненное место и сообщить о происшествии старшему по лаборатории;

10) после окончания работы инфицированный материал обеззараживают: заливают дезинфицирующим раствором, автоклавируют и т. п. Производят это под контролем ответственного лаборанта. Культуры, необходимые для дальнейшей работы, убирают в холодильник или сейф, которые закрывают и пломбируют;

11) после окончания работы со стола убирают все лишние предметы, а поверхность его дезинфицируют;

12) руки обрабатывают дезинфицирующим раствором и моют мылом.

Все виды микробов по степени болезнетворности и контагиозности разделяются на три группы.

К первым двум группам относятся возбудители особо опасных инфекций; к первой — возбудители чумы, холеры, вирус орнитоза и пситтакоза и др. Ко второй группе относятся возбудители сибирской язвы, туляремии, натуральной оспы, проказы, бешенства, сапа, трахомы и др. Третью группу составляют возбудители брюшного тифа, паратифов А и В, туберкулеза, газовой гангрены, столбняка, ботулизма, лептоспирозов и др. (список утвержден Государственной санитарной инспекцией Министерства здравоохранения СССР).

Работа с возбудителями первой и второй групп возможна только в специальных лабораториях и только по разрешению Главного санитарно-противоэпидемического управления Министерства здравоохранения СССР.

Работникам этих лабораторий делают профилактические прививки, обеспечивающие невосприимчивость к инфекционным заболеваниям, с возбудителями которых они могут встречаться при работе.

С остальными группами микробов работают по установленным для всех лабораторий правилам. Существует

единый порядок обращения, хранения, регистрации и отпуска заразных культур, установленный для всех бактериологических лабораторий. Культуры микроорганизмов хранят в закрытых и опечатанных сейфах, холодильниках или опечатанных помещениях. На пробирках с культурами пишут дату посева и номер культуры. На пробирки с культурами, которые хранятся в лаборатории длительное время, наклеивают этикетку из лейкопластыря или специальными чернилами указывают вид микроба, номер культуры и дату посева. Лабораторные культуры регистрируют в специальном журнале, в котором все страницы пронумерованы, прошнурованы и скреплены сургучной печатью. Культуры патогенных бактерий выдают только на основании письменного заявления и письменного разрешения заведующего лабораторией.

Для получения культур из другой лаборатории или выдачи за пределы лаборатории необходимо иметь следующие документы:

1) требование, подписанное руководителем учреждения и заверенное печатью;

2) письменное разрешение заведующего лабораторией;

3) для получения культуры необходимо иметь доверенность учреждения и паспорт.

Незнание и несоблюдение приведенных правил, неправильное хранение или небрежное обращение с патогенными микроорганизмами могут привести к тяжелым внутрилабораторным заражениям отдельных лиц, а иногда всего коллектива.

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроскопический метод — изучение живых или убитых микроорганизмов в окрашенном или неокрашенном виде с помощью микроскопа. Используют обычную микроскопию, микроскопию в темном поле, фазово-контрастную, люминесцентную и ультрамикроскопию. Для рассматривания объектов размером менее 0,2 мк применяют электронный микроскоп, дающий увеличение до 300 000. Иногда достаточно применить только микроскопический метод, чтобы идентифицировать возбудителей некоторых инфекций, например малярии, гонореи и др. Однако для большинства болезнетворных микроорганизмов метод микроскопии недостаточен, так как они

морфологически сходны с непатогенными микроорганизмами («незаразными»).

Микробиологический метод — выращивание микроорганизмов на питательных средах. При этом выделяют чистую культуру микроорганизмов и изучают их свойства. С этой целью исследуемый материал засевают на плотные и жидкие питательные среды.

Серологический метод — изучение свойств крови человека или животных при помощи специальных реакций. Этот метод используют для постановки диагноза, суждения о перенесенном заболевании, определения группы крови или видовой принадлежности белка.

Экспериментальный, или биологический, метод — изучение некоторых свойств микроорганизмов на лабораторных животных (мыши, крысы, морские свинки, кролики и т. п.).

Контрольные вопросы

1. Расскажите о правилах поведения в бактериологической лаборатории.
2. Какой существует порядок обращения, хранения и регистрации патогенных культур?
3. Что должен делать лаборант при нарушении целости сосуда, содержащего бактерии?
4. Перечислите методы микробиологического исследования.

Задание. Заполните форму № 2, указав, для какой цели используют каждый метод исследования.

Форма № 2

Микроскопический	Микробиологический	Биологический	Серологический

Глава 2. КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИХ МОРФОЛОГИИ

МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомить учащихся с систематикой микроорганизмов и морфологией бактерий.

Систематика микроорганизмов

Микроорганизмы — это мельчайшие, невидимые невооруженным глазом существа растительного и животного мира Земли. К микроорганизмам относят:

1) бактерии — микроорганизмы растительного происхождения. Их размер колеблется в пределах 0,15—40 микрон (мк);

2) риккетсии — микроорганизмы, занимающие промежуточное положение между бактериями и вирусами. Размер их 0,3—0,4 мк;

3) вирусы — особые инфекционные агенты, относящиеся к наиболее простым формам жизни, не имеющие клеточного строения. Размер их 10—450 ммк;

4) спирохеты — микроорганизмы, занимающие промежуточное положение между бактериями и простейшими. Их размер 7—500×1,5 мк;

5) простейшие — одноклеточные микроорганизмы животного происхождения;

6) грибы — микроорганизмы растительного происхождения разнообразной формы.

Размеры микроорганизмов чрезвычайно малы. Поэтому выявление и изучение их возможно только при помощи специальных оптических приборов — микроскопов.

Контрольные вопросы

1. Назовите основных представителей микроорганизмов.
2. Назовите микроорганизмы растительного мира.
3. Назовите микроорганизмы животного мира.
4. Назовите микроорганизмы, занимающие промежуточное положение.
5. При помощи каких приборов возможно изучение микроорганизмов?

Задание. Ознакомьтесь с учебными таблицами основных представителей мира микроорганизмов. Зарисуйте в тетради. Заполните в форме № 3 те графы, материалы для которых вы уже усвоили.

Бактерии и их основные формы

Бактерии занимают значительное место среди всего разнообразия мира микроорганизмов и являются одной из наиболее изученных групп.

По форме бактерии делят на шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии, или кокки (от греч. коккус — ягода) могут быть сферическими, бобовидными, ланцетовидными (т. е. закругленными с одной стороны и заостренными с другой) и эллипсоидными. В зависимости от расположения клеток после деления кокки подразделяют на следующие группы:

микрококки (от греч. микрос — малый) — кокки правильной формы, деление и расположение после деления беспорядочное;

диплококки (от греч. диплос — двойной). Делятся в одной плоскости, после деления располагаются попарно. Могут быть бобовидной, ланцетовидной и круглой формы;

стрептококки (от греч. стрептос — цепочка). Делятся в одной плоскости, образуя цепочки. Отдельные виды вызывают гнойные заболевания;

стафилококки (от греч. стафиле — виноградная гроздь). Делятся в нескольких плоскостях, располагаются в виде виноградной грозди. Отдельные представители вызывают гнойные заболевания;

тетракокки (от греч. тетра — четыре). Делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, располагаются по четыре;

сарцины (от лат. сарцио — связываю). Делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, располагаются в виде тюков или пакетов по 8 или 16 кокков.

Контрольные вопросы

1. Назовите возможные размеры бактериальных клеток.
2. Какие формы бактерий Вы знаете?
3. Почему шаровидные бактерии называют кокками?
4. Назовите формы кокков.
5. Что служит основанием для деления кокков на группы?
6. Перечислите основные группы кокков.
7. Расскажите об особенностях деления, расположения и формы кокков.

Задание. Ознакомьтесь с рис. 1—I. Возьмите готовые препараты и изучите их под микроскопом при помощи иммерсионной системы. Зарисуйте в тетрадь отдельных представителей группы кокков. Заполните форму № 4.

Внимание! Готовые препараты являются музейными, их нельзя опускать в дезинфицирующий раствор, так как при этом они разрушаются. Мягкой фланелькой или марлей удалите с препаратов иммерсионное масло и верните преподавателю.

Форма № 3

Систематическое положение	Размер	Происхождение (растительное или животное)	Особенности строения бактерий
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Палочковидные бактерии, или просто бактерии (от греч. бактерион — палочка), подразделяются на бактерии, не образующие спор, и бактерии, образующие споры. К первым относятся возбудители чумы, туляремии, дизентерии, брюшного тифа, коклюша и т. д. К бациллам, т. е. бактериям, образующим споры, относятся возбудители сибирской язвы, газовой гангрены, столбняка, ботулизма и т. д.

Большое значение для идентификации бактерий имеют их расположение и особенности формы. Бактерии, которые располагаются попарно, называют диплобактериями. Если диплобактерии образуют споры, их называют диплобациллами. Бактерии, располагающиеся цепочкой, называют стрептобактериями. При образовании стрептобактериями спор их называют стрептобациллами.

По форме различают палочки яйцевидной формы с заостренными концами (возбудители чумы); палочки с обрубленными концами (возбудители сибирской язвы); палочки цилиндрической формы с закругленными краями (возбудители дизентерии, брюшного тифа); палочки, по форме приближающиеся к коккам (возбудители коклюша).

Контрольные вопросы

1. На какие две группы подразделяются палочковидные бактерии и по какому признаку?
2. Назовите отдельных представителей бактерий, не образующих спор.
3. Назовите отдельных представителей бактерий, образующих споры.
4. Как называются бактерии, которые располагаются попарно и не образуют спор?

5. Как называются бактерии, располагающиеся цепочкой:
а) образующие споры;
б) не образующие споры?
6. Расскажите об особенностях форм бактерий.

Задание. Возьмите готовые препараты палочковидных бактерий и изучите их под микроскопом при помощи иммерсионной системы.

Ознакомьтесь с рис. I—II.

Зарисуйте в тетрадь отдельных представителей палочковидных бактерий.

Извитые бактерии представлены вибрионами и спириллами. Вибрионы — формы, имеющие вид запятой ($^1/_4$ оборота спирали). Характерным представителем этой группы является возбудитель азиатской холеры — холерный вибрион.

Спириллы — формы бактерий, имеющие от одного до нескольких завитков. Представители этой группы обычно не вызывают заболеваний у человека. Исключение представляет возбудитель содоку.

Контрольные вопросы

1. На какие две группы делятся представители извитых бактерий?
2. Расскажите о морфологии вибрионов и спирилл.

Задание. Возьмите готовые препараты извитых бактерий и изучите их под микроскопом при помощи иммерсионной системы.

Ознакомьтесь с рис. I—III.

Зарисуйте в тетрадь рассмотренные препараты.

Внимание! После окончания занятий не забудьте выключить осветители, протереть объективы и поставить микроскопы на место.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомить учащихся с техникой приготовления мазков.

С помощью микроскопа микробы изучают в окрашенном и неокрашенном виде. Но, прежде чем готовить препараты, необходимо отметить, что от качества приготовления препарата зависит результат исследования под микроскопом.

Обработка предметных и покровных стекол

Для работы необходимо иметь специально приготовленные предметные и покровные стекла. Стекла должны быть чистыми и обезжиренными. Для обезжиривания

стекла помещают в сосуды с притертой пробкой, в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира) или в 96° спирт. Перед работой необработанные стекла можно обезжирить следующим образом: рабочую поверхность стекла натереть мылом, которое затем удалить чистой сухой тканью.

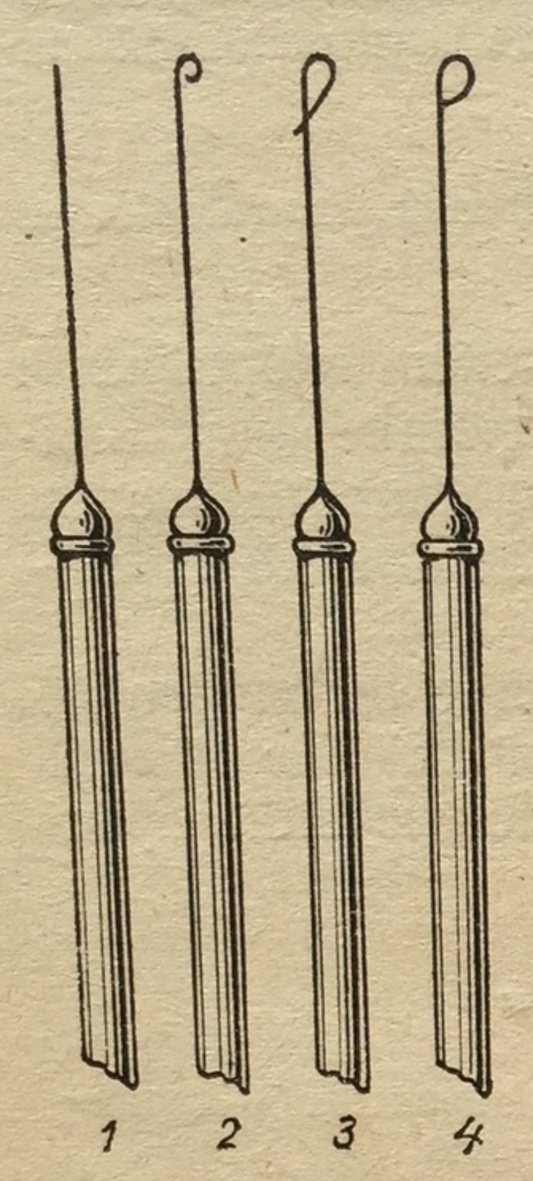


Рис. 2.
1 — игла (для посева уколом); 2 — петля Пастера для посевов; 3 — петля приготовлена неправильно; 4 — петля приготовлена правильно.

Внимание! Из обезжиривающих растворов стекла извлекают пинцетом. При работе стекла держат пальцами за ребро.

Материалом для исследования могут служить испражнения, гной, мокрота, кровь, рвотные массы и т. д., а также культуры микроорганизмов, выросшие на плотных и жидких питательных средах.

В зависимости от характера исследуемого материала при заборе используют бактериологическую петлю, пастеровскую пипетку или иглу. Петлю делают из платиновой или нихромовой (сплав хрома с никелем) нити длиной 5—6 см, закрепляют в петледержателе или впаивают в стеклянную палочку. Конец проволоки сгибают в виде плотно замкнутой петли размером 1×1,5 или 2×3 мм (рис. 2). Петлю держат как карандаш. Рабочую часть петли прожигают в пламени горелки в вертикальном положении, сначала конец петли, затем постепенно всю металлическую часть.

Приготовление мазка из культуры, выращенной на плотной питательной среде

Обезжиренное предметное стекло прожигают в пламени горелки. На охлажденное предметное стекло, положенное на рабочий стол, петлей наносят каплю физиологического раствора. Пробирку с изучаемой культурой держат между указательным и большим пальцами левой руки. Бактериологическую петлю берут правой рукой и прожигают ее в пламени горелки. Не выпуская петли из правой руки, мизинцем прижимают пробку к ладони и

спокойно вынимают из пробирки. Движения не должны быть резкими и размашистыми. Во время манипуляции с пробиркой пробка находится в руке. Прожигают пробку и горло пробирки в пламени горелки. Вводят петлю в пробирку. Охлаждают петлю о стенку пробирки, чтобы горячая петля не убила выросшую культуру. Захватывают

Форма № 4

Морфология бактерий	Закономерности деления	Расположение после деления	Особенности формы	Отдельные представители

петлей культуру и выводят ее из пробирки, не касаясь стенок. Держа петлю с культурой, закрывают пробирку пробкой над пламенем горелки. Ставят пробирку в штатив. Петлю с культурой опускают на стекло и растирают материал рядом с каплей физиологического раствора, а затем постепенно эмульгируют в физиологическом растворе. Остатки культуры на петле сжигают в пламени горелки. Мазок оставляют для высыхания.

Внимание! Мазок должен быть тонким, равномерно растертым и небольшим.

Приготовление мазка из культуры, выращенной на жидкой питательной среде

Каплю культуры наносят на обезжиренное стекло петлей или пастеровской пипеткой, соблюдая описанный выше порядок работы.

Внимание! Пипетку после работы помещают в дезинфицирующий раствор, всегда находящийся на рабочем месте лаборанта.

Мазок оставляют для высыхания.

Приготовление мазка из гноя или мокроты

Материал забирают стерильной пипеткой или петлей и наносят на середину предметного стекла. Затем вторым предметным стеклом покрывают первое так, чтобы остались свободными треть первого и второго стекол. Стекла раздвигают в стороны и получают два отдельных больших мазка.

Приготовление мазков из крови

Каплю крови наносят на границу между левой и средней третью предметного стекла. Затем краем второго специально отшлифованного стекла прикасаются к капле крови, располагая стекло под углом в 45°. Прижимая отшлифованное стекло к предметному, продвигают его. Хорошо сделанный мазок имеет желтоватый цвет и просвечивает.

Приготовление мазков-отпечатков из внутренних органов трупов и пищевых продуктов твердой консистенции

Раскаленным скальпелем прижигают поверхность органа или пищевого продукта и из этого участка вырезают кусочек материала. Разрезанной поверхностью прикасаются к стеклу в 2—3 местах.

Высушивание мазка

Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате. В случае необходимости можно высушить их над пламенем горелки, держа стекло за края большим и указательным пальцами мазком вверх. Средний палец помещают под стекло, чтобы контролировать степень нагревания.

Внимание! При высокой температуре может произойти нарушение структуры клеток.

Фиксация мазка

Мазки фиксируют после полного высыхания с целью:
1) закрепить микробы на стекле;
2) обезвредить культуру;
3) убитые микробы лучше воспринимают окраску.

Способы фиксации мазков

1. В пламени горелки мазки фиксируют следующим образом: стекло берут большим и указательным пальцами или пинцетом и троекратно проводят через верхнюю часть пламени горелки (6 секунд).

2. Фиксация в жидкости: клеточные элементы в мазках из крови и в мазках-отпечатках при действии высоких температур разрушаются, поэтому их обрабатывают фиксирующей жидкостью:

а) метиловым спиртом — 5 минут;
б) этиловым спиртом — 10 минут;
в) смесью Никифорова — 10—15 минут;
г) ацетоном — 5 минут;
д) парами кислоты и формалина — несколько секунд.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о методах исследования под микроскопом.
2. Как обрабатывают предметные и покровные стекла?
3. Как приготовить бактериологическую петлю?
4. Что может служить материалом для исследования?
5. Из каких этапов складывается процесс приготовления мазка?
6. Как приготовить мазок из культуры, выращенной на плотной питательной среде; жидкой питательной среде; из гноя; крови; внутренних органов трупов и пищевых продуктов твердой консистенции?
7. С какой целью и как высушивают мазки?
8. С какой целью и как фиксируют мазки?

Задание. Приготовьте бактериологическую петлю. Приготовьте мазки из культуры, выращенной на жидкой и плотной питательных средах. Высушите и зафиксируйте их в пламени горелки.

Окраска препаратов

Следующим этапом приготовления препарата является его окраска.

Микроорганизмы различно относятся к краскам — эти свойства называют тинкториальными. Наиболее широко в микробиологии используют анилиновые красители основного и кислого характера. Большинство микробов лучше воспринимает основные красители.

Для окраски мазков применяют следующие красители:

1) красные (фуксин основной, фуксин кислый, нейтральный красный, конгорот);

2) синие (метиленовый и толуидиновый);

3) фиолетовые (генцианфиолетовый, метиловый фиолетовый, кристаллический фиолетовый);

4) коричнево-желтые (везувин, хризоидин);

5) зеленые (бриллиантовый зеленый, малахитовый зеленый).

Способы окраски можно в основном разделить на две группы: ориентировочные, или простые, и дифференциальные: сложные, выявляющие химические и структурные особенности бактериальной клетки. Для окраски используют водно-феноловые и водно-спиртовые растворы, которые готовят из насыщенных спиртовых и феноловых растворов красок.

Рецепты красок

1. Насыщенные спиртовые растворы:

красителя	1 г
спирта 96°	10 мл

Смесь помещают в термостат на несколько дней для полного растворения. Ежедневно смесь взбалтывают.

2. Карболовый фуксин Циля (применяют для окраски кислотоустойчивых микроорганизмов, спор и капсул):

основной фуксин	1 г
спирт 96°	10 мл
фенол кристаллический	5 г
глицерин	несколько капель
вода дистиллированная	100 мл

Фуксин с кристаллами фенола и несколькими каплями глицерина растирают в ступке до получения гомогенной массы, добавляя малыми порциями спирт, при помешивании добавляют воду. Помещают в термостат на 48 часов, затем фильтруют. Срок хранения длительный.

3. Фуксин Пфейффера используют для окраски по Граму и для простого метода окраски:

Фуксин Циля	1 мл
вода дистиллированная	9 мл

Краску готовят непосредственно перед применением.

4. Карболовый генцианфиолетовый применяют при окраске по Граму:

генцианфиолетовый	1 г
спирт 96°	10 мл

кристаллы карболовой кислоты	2 г
дистиллированная вода	100 мл

Растирают в ступке краситель с карболовой кислотой до получения кашицеобразной массы, прибавляют небольшими порциями спирт и разводят водой. Сливают в бутыль, помещают в термостат, фильтруют.

5. Раствор Люголя:

йодистый калий	2 г
дистиллированная вода	10 мл
кристаллический йод	1 г

Смесь помещают в бутыль матового стекла, хорошо закупоривают и ставят на сутки в термостат, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды.

6. Щелочная синь Леффлера:

насыщенный спиртовой раствор метиленового синего	30 мл
1% раствор КОН	1 мл
дистиллированная вода	100 мл

7. Бумажки по Синеву. Полоски фильтровальной бумаги пропитывают 1% спиртовым раствором кристаллфиолетового и высушивают. Используют при окраске по методу Грама.

Оборудование стола для окраски

Окраску мазков производят на специально оборудованном столе, покрытом линолеумом, пластиком, стеклом и т. п. На столе держат сосуд с дистиллированной водой, емкость для слива красок, подставку из двух стеклянных трубочек или палочек, соединенных с обеих сторон резиновыми трубками, пинцеты, цилиндры разных размеров, градуированные и глазные пипетки, фильтровальную бумагу, набор красок, часто употребляемых в работе.

Желательно, чтобы стол для окраски находился рядом с водопроводным краном.

Простой метод окраски мазков

Зафиксированный мазок помещают на подставку для окраски исследуемым материалом вверх. Пипеткой наносят раствор краски, чтобы покрыть весь мазок. По ис-

течении указанного времени краситель осторожно сливают, препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. При этом методе используют лишь одну краску.

Щелочной синью Леффлера окрашивают в течение 3—5 минут, фуксином Пфейффера 1—2 минуты.

На окрашенный препарат наносят каплю кедрового масла и микроскопируют с помощью иммерсионной системы. При просмотре препарата сухой системой световые лучи, идущие от зеркала в объективе, проходят через неоднородные среды. Лучи отклоняются и не попадают в объектив, что создает плохое освещение препарата. При использовании иммерсионной системы, включающей иммерсионный объектив с увеличением 90 или 120 и кедровое масло, этот недостаток устраняется. Показатель преломления кедрового масла такой же, как у стекла, поэтому для световых лучей создается однородная среда.

Методы дифференциальной окраски

Одним из наиболее часто применяемых методов дифференциальной окраски является окраска по Граму. В зависимости от окраски по Граму все бактерии делятся на две группы. Грамположительные бактерии образуют прочное соединение с фиолетовой краской; бактерии, не воспринимающие этой краски, называются грамотрицательными.

Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит магниевую соль РНК, которая образует прочное комплексное соединение с йодом и синей краской (генцианфиолетовым, метилфиолетовым и т. п.). Этот комплекс не разрушается при воздействии спирта и бактерии сохраняют первоначальный фиолетовый цвет.

Грамотрицательные бактерии не содержат магниевой соли РНК и поэтому не способны удержать фиолетовую краску. Под действием спирта они обесцвечиваются, а окрашиваются в красный цвет фуксином Пфейффера.

Окраска по Граму

1. На фиксированный мазок накладывают полоску бумаги, приготовленную по методу Синева, и наносят несколько капель воды или непосредственно на мазок наносят раствор генцианфиолетовой краски на 1—2 минуты.

2. Снимают пинцетом бумагу. Не промывая препарата водой, сливают краску и наносят раствор Люголя на минуту, до полного почернения.

3. Сливают раствор Люголя, не промывая водой, погружают препарат в стаканчик с 96° спиртом на 20—30 секунд. Обесцвечивание производят до отхождения фиолетовых струй краски.

4. Препарат тщательно промывают водой для удаления спирта.

5. Докрашивают препарат фуксином Пфейффера в течение 3 минут. Краску смывают водой, препарат высушивают и микроскопируют при помощи иммерсионной системы.

Грамположительные микробы окрашиваются в фиолетовый цвет.

Грамотрицательные микробы окрашиваются в красный цвет (розовый).

В некоторых случаях окраска по Граму позволяет судить о характере возбудителя.

Окраска по Цилю — Нильсену

Применяют для выявления кислотоустойчивых бактерий туберкулеза. Для увеличения степени проницаемости бактериальной стенки препарат окрашивают фуксином Циля при подогревании. Окрашенные микроорганизмы не обесцвечиваются слабыми растворами минеральных кислот и спиртами. Явление кислотоустойчивости объясняется наличием в оболочке микробных клеток липидов, воска и оксикислот.

1. Фиксированный мазок покрывают фильтровальной бумагой и наливают фуксин Циля. Затем, удерживая препарат пинцетом, мазок подогревают в пламени горелки до отхождения паров. Добавляют новую порцию краски и повторяют манипуляцию 2—3 раза. После охлаждения снимают бумагу и промывают водой.

2. Препарат обесцвечивают 5% раствором серной кислоты, погружая его 2—3 раза в раствор или наливая этот раствор на мазок, затем препарат несколько раз промывают водой.

3. Окрашивают водно-спиртовым раствором метиленового синего в течение 3—5 минут, промывают водой, высушивают и микроскопируют с помощью иммерсионной системы.

Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в красный цвет, другие формы приобретают синюю окраску.

Сложные методы окраски будут рассмотрены в разделе, посвященном строению бактериальной клетки.

Прижизненная окраска микробов

При этом методе используют красители в большом разведении (1 : 10 000). На предметном стекле смешивают каплю исследуемого материала с раствором краски (метиленовый синий, нейтральный красный и т. п.). Препараты микроскопируют с помощью объектива × 40.

Контрольные вопросы

1. Что такое тинкториальные свойства микробов?
2. Какие краски применяют в микробиологической практике?
3. Расскажите об оборудовании стола для красок.
4. Техника простого метода окраски мазков. Краски, используемые при этом методе.
5. Дифференциальная окраска микробов. Метод Грама.

Задание. Окрасьте зафиксированные мазки простым методом и по методу Грама. Изучите их под микроскопом и зарисуйте в тетрадь (цветными карандашами).

СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель занятия: ознакомить учащихся со структурой бактериальной клетки и методами окраски, позволяющими выявить и изучить ее.

Изучают строение бактериальной клетки, применяя сложные методы окраски и тончайшую оптическую технику.

Обособленного ядра в бактериальной клетке нет. Оно находится в цитоплазме в рассеянном состоянии. Ядерное вещество окрашивается при использовании сложного метода окраски — метода Фельгена-Шиффа — в красно-фиолетовый цвет, а цитоплазма микробной клетки — в розовый.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные элементы бактериальной клетки.
2. Что способствует выявлению и изучению структурных элементов бактериальной клетки?

3. Что представляет собой ядро бактериальной клетки?

4. В какой цвет окрашивается ядерное вещество и каким методом окраски?

Задание. Ознакомьтесь с рис. 3 и зарисуйте его в тетрадь.

Цитоплазма состоит из белков, жиров, углеводов, органических соединений, минеральных веществ и воды.

Включения — скопления определенных веществ: гликогена, крахмала, жира, белка. Наличие отдельных включений имеет диагностическое значение для идентификации некоторых бактерий. Наличие включений в виде зерен волютина позволяет дифференцировать возбудителей дифтерии от непатогенных представителей того же семейства, сходных по морфологии с первыми.

Зерна волютина представляют собой комплекс РНК и неорганических фосфатов. Окрашиваются по методу Леффлера и уксуснокислым метиленовым синим.

Для лучшего выявления зерен волютина служит окраска по Нейссеру. При этом методе цитоплазма окрашивается в желтый цвет, а гранулы волютина — в синечерный. Краситель Нейссера состоит из двух растворов, состав которых приведен ниже.

Раствор А. Уксуснокислый метиленовый синий по Нейссеру:

метиленовый синий	0,1 г
96° спирт	2 мл
ледяная уксусная кислота	5 мл
дистиллированная вода	100 мл

Раствор Б. Везувин:

везувин	2 г
96° спирт	60 мл
дистиллированная вода	40 мл

Смесь кипятят и после охлаждения фильтруют.

Окраска по Леффлеру (простой способ)

На фиксированный мазок на 5—10 минут наливают краску, состоящую из 0,25 г метиленового синего и 100 мл 5% раствора CH_3COOH. Мазок промывают и высушивают.

Цитоплазма окрашивается в светло-сиреневый цвет, зерна волютина — в темно-лиловый.

Окраска по Нейссеру (сложный способ)

На фиксированный мазок наливают раствор А на 1 минуту, затем его сливают, мазок промывают водой и наливают раствор Люголя на 20—30 секунд. Не промывая мазок водой, наливают раствор Б на 10—15 минут, после чего мазок промывают и микроскопируют.

Контрольные вопросы

1. Из чего состоит цитоплазма?
2. Чем образованы включения?
3. Какое значение имеет наличие некоторых включений?
4. Перечислите методы окраски включений.
5. Для чего служит окраска по Нейссеру?
6. В какой цвет окрашивается цитоплазма и зерна волютина при использовании метода Нейссера?

Задание. Приготовьте и зафиксируйте мазки из культуры бактерий дифтерии. Окрасьте мазок с помощью простого и сложного методов окраски. Изучите препараты под микроскопом и зарисуйте в тетрадь цветными карандашами.

Опишите методы окраски.

Капсула

Некоторые виды бактерий образуют капсулу, которая защищает их от неблагоприятных воздействий внешней среды. Капсула образуется за счет утолщения оболочки клетки. Она может отделяться от оболочки в виде самостоятельного секретирующего слоя. Состоит капсула из полисахаридов, иногда протеинов. Выявление капсул возможно с помощью окраски по Бурри-Гинсу.

Контрольные вопросы

1. Какой оболочкой обладают бактериальные клетки?
2. Каково строение и химический состав оболочки?
3. При каких условиях образуется капсула?
4. За счет какого структурного элемента клетки образуется капсула?
5. Является ли капсула самостоятельным слоем?
6. Химический состав капсулы.
7. Какой метод окраски служит для выявления капсул?

Задание. Окраска капсул по Бурри-Гинсу. На предметное стекло нанести пипеткой каплю исследуемой культуры (антракоида) и черной туши, разведенной водой в 10 раз. Каплю равномерно распределить по поверхности и высушить на воздухе. Затем налить 2—3 капли спирта и сжечь его на стекле. Этим достигают фиксации мазка. На подставку для окраски положить препарат, налить фуксин

Пфейффера на 3—5 минут. Промыть водой и высушить. Изучить под микроскопом с помощью иммерсионной системы. Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсула не окрашивается, контрастно выделяется на темном фоне препарата. Препарат зарисовать цветными карандашами. Запишите в тетрадь способ окраски по Бурри-Гинсу.

Споры

Одним из способов переживания неблагоприятных условий внешней среды у некоторых бактерий является образование спор. Бактерии, образующие споры, называются бациллами. Споры имеют круглую или яйце-

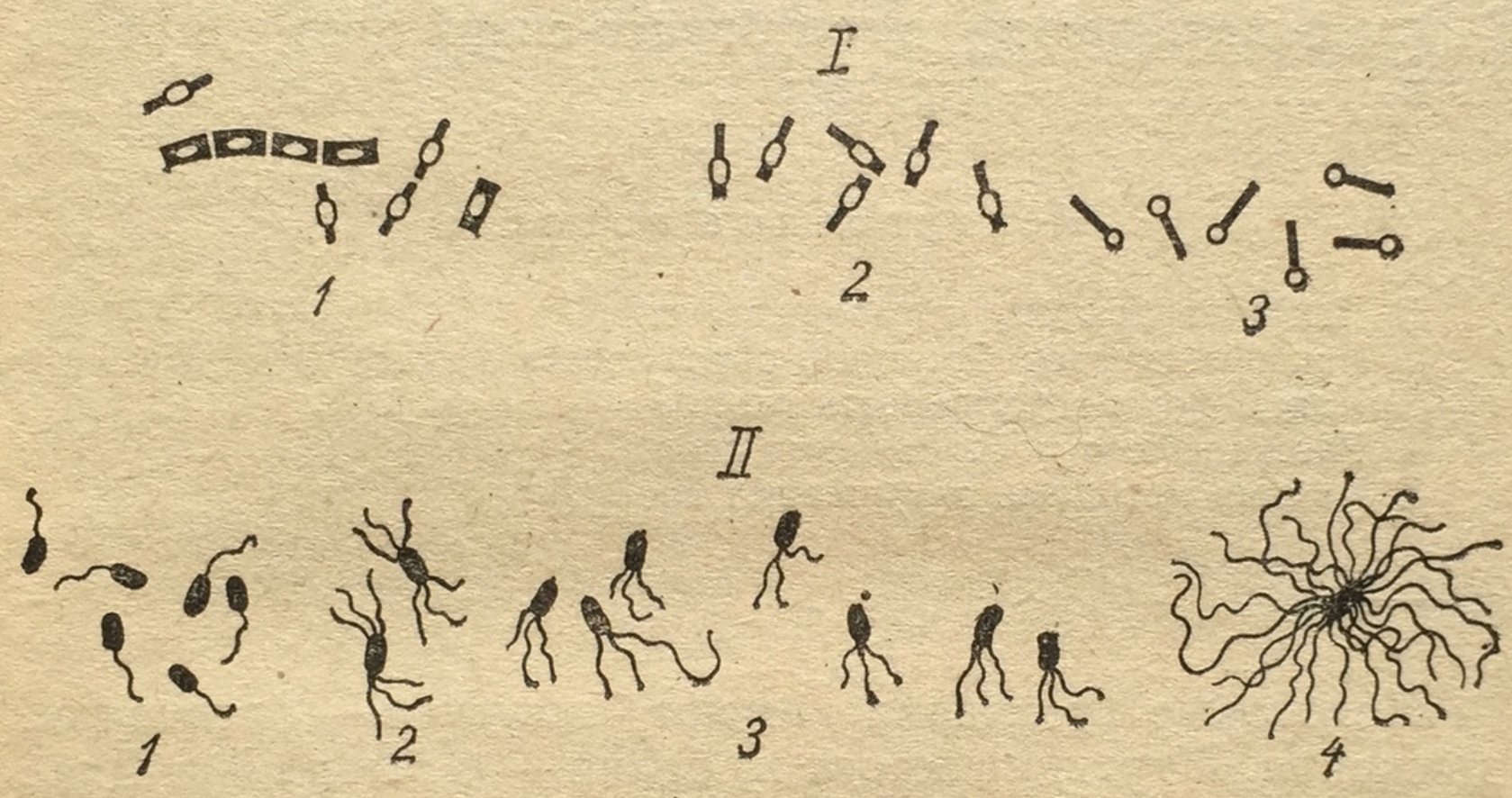


Рис. 4. Варианты расположения жгутиков и спор.
I — расположение спор в бациллах: *1* — центральное; *2* — субтерминальное; *3* — терминальное. *II* — жгутики бактерий: *1* — монотрихи; *2* — амфотрихи; *3* — лофотрихи; *4* — перетрихи.

видную форму. Они могут располагаться в центре клетки — **центрально**, близко к концу — **субтерминально** и на конце — **терминально**. Расположение спор имеет диагностическое значение. Споры окрашивают по методу Ожешко и методу Пешкова.

Задание. Ознакомьтесь с рис. 4—I, зарисуйте в тетрадь возможные варианты расположения спор.

Окраска спор

Окраска спор по методу Ожешко. Мазок высушивают на воздухе, наливают несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогревают до образования паров.

Затем препарат промывают водой, высушивают, фиксируют над пламенем и окрашивают по способу Циля — Нильсена. Споры имеют розово-красный, а бактериальная клетка — голубой цвет.

Окраска спор по методу Пешкова. На мазок, фиксированный в пламени, наносят несколько капель метиленового синего по Леффлеру. Препарат нагревают в средней части пламени, кипятят 15—20 секунд, не допуская высыхания.

2. Остывший препарат промывают водой, докрашивают 0,5% раствором нейтрального красного в течение 30 секунд. Затем снова промывают водой и высушивают. Споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, а бактериальная клетка — в розовый.

Контрольные вопросы

1. Назовите причину образования спор.
2. Как называются бактерии, образующие споры?
3. Какой формы могут быть споры?
4. Расскажите о расположении спор.
5. Какими методами окрашивают споры?

Жгутики

Некоторые бактерии имеют жгутики — органеллы движения. Жгутики состоят из белка — флагеллина. Длина жгутиков может во много раз превышать размер самих бактерий. Жгутики берут начало в цитоплазме и располагаются по поверхности бактериальной клетки. По характеру расположения жгутиков подвижные бактерии делят на четыре группы: 1) монотрихи — бактерии с одним жгутиком на конце (холерный вибрион); 2) амфотрихи — бактерии с пучком жгутиков на обоих полюсах клетки; 3) лофотрихи — бактерии с пучком жгутиков на одном конце (фекальный щелочеобразователь); 4) — перитрихи — бактерии со жгутиками, расположенными по периферии бактериальной клетки (кишечная палочка и др.).

Контрольные вопросы

1. Как передвигаются бактерии?
2. Из чего состоят жгутики?
3. На какие группы делят подвижные бактерии и почему?

Задание. Ознакомьтесь с рис. 4—II. Зарисуйте его в тетрадь.

Изучение подвижности бактерий

Для изучения формы и подвижности бактерий используют микроскопию в неокрашенной культуре. С этой целью готовят препараты висячей и раздавленной капли.

Исследование висячей капли. Используют специальное стекло с луночкой, покровное стекло, вазелин.

Края луночки покрывают небольшим слоем вазелина. На покровное стекло пастеровской пипеткой наносят каплю исследуемого материала. Если исследуемая культура выращена на плотной питательной среде, то на покровное стекло наносят взвесь бактерий в физиологическом растворе. Затем осторожно стеклом с луночкой накрывают покровное стекло с каплей культуры так, чтобы капля оказалась в центре. Получается герметически закрытая камера. Склеившиеся стекла быстро переворачивают вверх покровным стеклом (рис. 5).

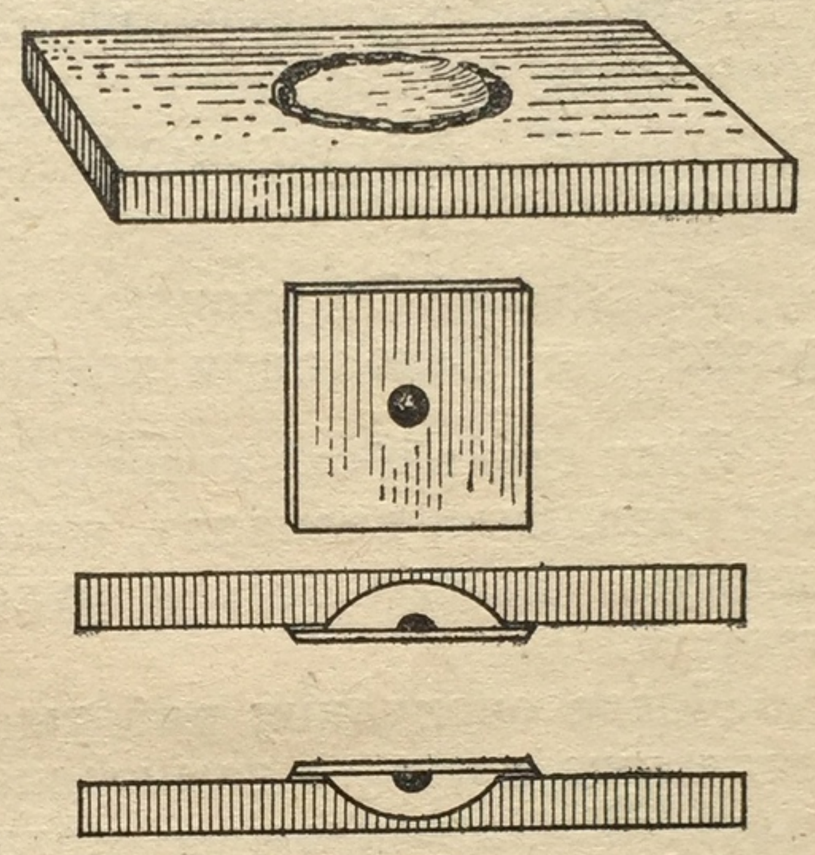


Рис. 5. Камера с висячей каплей.

Если препарат приготовлен правильно, капля будет висеть в камере и не высохнет в течение длительного времени. Определение подвижности во многих случаях является дифференциальным признаком возбудителя.

Исследование раздавленной капли. На предметное стекло наносят пипеткой каплю культуры и покрывают ее покровным стеклом. Желательно, чтобы при этом не образовались пузырьки воздуха, мешающие изучению препарата под микроскопом. Чтобы препарат быстро не высыхал, его помещают во влажную камеру. Влажная камера представляет собой чашку Петри, на дно которой положена влажная фильтровальная бумага. На бумагу кладут две спички и на них помещают препарат. Для исследования препарат извлекают и микроскопируют так же, как и препарат висячей капли.

Подвижность изучают в темном поле, для создания которого слегка опускают конденсор или используют специальный темнопольный конденсор.

Контрольные вопросы

1. Какие Вы знаете методы изучения подвижности микроорганизмов в неокрашенном виде?
2. Расскажите об исследовании висячей капли.
3. Расскажите об исследовании раздавленной капли.
4. С какой целью и как готовят влажную камеру?

Задание. 1. Приготовьте препарат висячей капли из культур, выращенных на жидкой питательной среде.

2. Приготовьте препарат раздавленной капли. Изучите приготовленные препараты под микроскопом.

При малом увеличении найдите край капли, имеющий волнистые блестящие очертания. Затем найдите центр препарата. Манипулируя макровинтом, найдите поле зрения.

Внимание! Осторожно работайте макровинтом, не раздавите объективом покровное стекло.

Если при работе культура попала на рабочий стол или Вы раздавили препарат, немедленно обработайте загрязненную поверхность и руки дезинфицирующим раствором.

После окончания работы положите препараты в специальную посуду с дезинфицирующим раствором. Стекла с луночкой и покровные стекла моют отдельно.

Зарисуйте в тетрадь общий вид приготовленного препарата и отдельное поле зрения.

Глава 3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Цель занятия: научить учащихся пользоваться аппаратурой, используемой для стерилизации; познакомить учащихся с основными методами стерилизации.

Стерилизация — это **обеспложивание**, т. е. полное освобождение объектов внешней среды от микроорганизмов.

Стерилизацию производят различными способами:

1) физическими (воздействие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей, использование бактериальных фильтров);

2) химическими (использование различных антисептиков для консервирования питательных сред);

3) биологическим (применение антибиотиков).

В лабораторной практике обычно применяют физические способы стерилизации. Возможность и целесообразность использования того или иного способа стерилизации обусловлены особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими и химическими свойствами.

ФИЗИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Прокаливание на пламени горелки, или фламбирование, — способ стерилизации, при котором происходит полное обеспложивание объекта, так как погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Обычно прокаливают бактериологические петли, шпатели, пипетки, предметные и покровные стекла, мелкие инструменты. Не следует стерилизовать прокаливанием ножницы, скальпели, так как под действием огня режущая поверхность становится тупой.

Сухожаровая стерилизация

Стерилизацию сухим жаром или горячим воздухом осуществляют в печах Пастера (сушильных шкафах). Печь Пастера (рис. 6) — шкаф с двойными стенками, изготовленный из термостойких материалов — металла и асбеста. Нагревают шкаф с помощью газовых горелок или электронагревательных приборов. Шкафы с электрическим нагревом снабжены регуляторами, обеспечивающими необходимую температуру. Для контроля температуры имеется термометр, вставленный в отверстие верхней стенки шкафа. Там же имеется отверстие для выхода горячего воздуха.

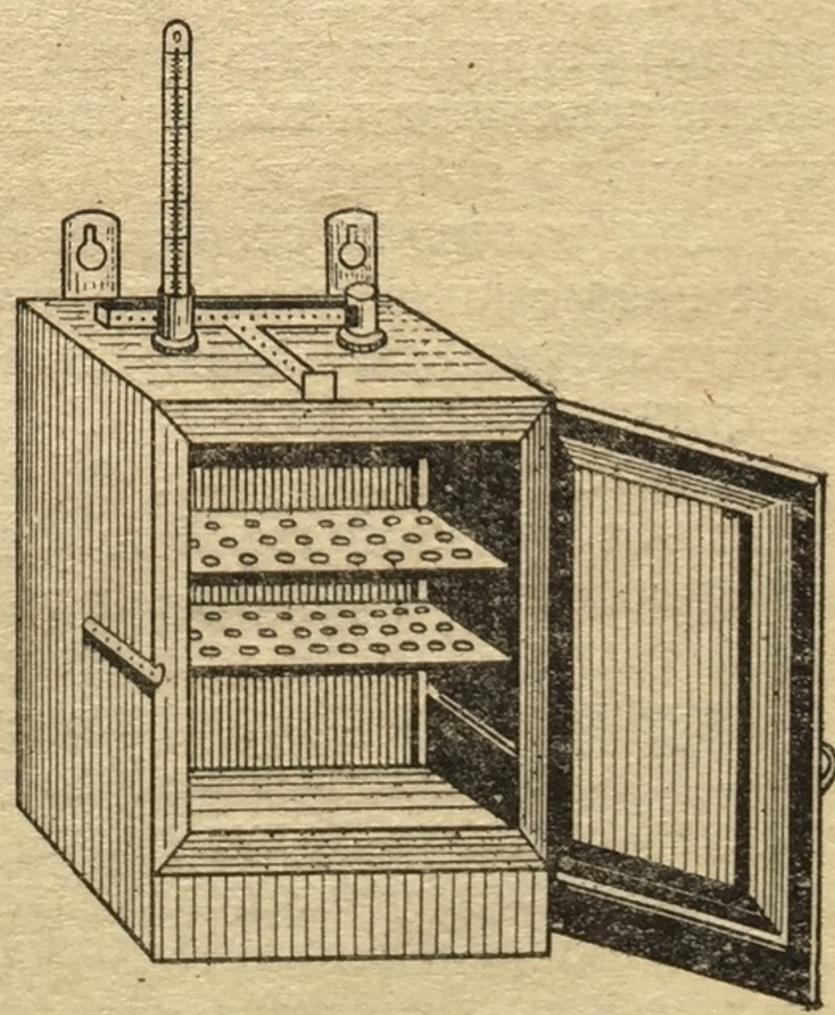


Рис. 6. Печь Пастера.

Сухим жаром стерилизуют в основном лабораторную посуду.

Подготовленную для стерилизации посуду неплотно загружают в печь, чтобы обеспечить равномерный и надежный прогрев стерилизуемого материала. Дверь шкафа плотно закрывают, включают обогревательный прибор, доводят температуру до 160—165° и при этой температуре стерилизуют 1 час. По окончании стерилизации выключают обогрев, но дверцу шкафа не открывают до тех пор, пока печь не остынет; в противном случае доступ холодного воздуха, поступающего внутрь шкафа, может вызвать образование трещин на горячей посуде.

Стерилизацию в печи Пастера можно проводить при различном температурном режиме и экспозиции (время стерилизации) (табл. 1).

Таблица 1

Режим стерилизации

Температура, °С	Экспозиция, мин
160—165	60
180	15
200	5

Жидкости (питательные среды, физиологический раствор и др.), предметы из резины и синтетических материалов стерилизовать сухим жаром **нельзя,** так как жидкости вскипают и выливаются, а резина и синтетические материалы плавятся.

Для контроля стерилизации в печи Пастера шелковые нити смачивают в культуре спорообразующих бактерий, подсушивают, помещают в стерильную чашку Петри и ставят в печь Пастера. Стерилизацию проводят при температуре 165° 1 час. (Для контроля часть нитей оставляют при комнатной температуре.) Затем простерилизованные и контрольные нити кладут на поверхность агара в чашку Петри или помещают в пробирки с бульоном и инкубируют в термостате при температуре 37° двое суток. При правильной работе печи Пастера простерилизованные нити не дадут роста, так как споры погибнут, а контрольные прорастут.

Для определения температуры внутри печи Пастера можно использовать сахарозу или пищевой сахарный песок, которые карамелизуются при температуре 165—170°.

Подготовка лабораторной посуды к стерилизации в печи Пастера

Лабораторную посуду (чашки Петри, пипетки градуированные и пастеровские, флаконы, колбы, пробирки) перед стерилизацией необходимо тщательно вымыть, высушить и завернуть в бумагу, иначе после стерилизации она может снова загрязниться бактериями из воздуха.

Чашки Петри завертывают в бумагу по одной или несколько штук, либо укладывают в специальные металлические пеналы.

В верхние концы пипеток вставляют ватные тампоны, предупреждающие попадание материала в рот. Градуированные пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4—5 см. На бумаге отмечают объем завернутой пипетки. При наличии пеналов градуированные пипетки стерилизуют в них.

Острые концы пастеровских пипеток запаивают на пламени горелки и заворачивают в бумагу по 10—15 штук. Заворачивать пастеровские пипетки нужно осторожно, чтобы не обломать запаянные концы капилляров.

Флаконы, колбы, пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробка должна входить в горлышко сосуда на две трети своей длины, не слишком туго, но и не свободно. Поверх пробок на каждый сосуд (кроме пробирок) надевают бумажный колпачок. Пробирки связывают по 5—50 штук и обертывают поверх пробок бумагой.

Примечание. При высоких температурах бумага, в которую заворачивают чашки и пипетки, и вата желтеют и даже могут обугливаться, поэтому каждый новый сорт бумаги, получаемый лабораторией, следует испытывать при принятом температурном режиме.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под термином «стерилизация»?
2. Какими способами проводят стерилизацию?
3. Что стерилизуют прокаливанием на огне?
4. Опишите устройство и режим работы печи Пастера.
5. Что стерилизуют в печи Пастера?
6. Как подготовляют стеклянную посуду к стерилизации?
7. Почему в печи Пастера нельзя стерилизовать питательные среды и предметы из резины?

Задание. Подготовьте к стерилизации чашки Петри, градуированные пипетки, пастеровские пипетки, пробирки, колбы и флаконы.

Стерилизация кипячением

Кипячение — способ стерилизации, гарантирующий обеспложивание, при условии отсутствия в стерилизуемом материале спор. Применяют для обработки шприцев, инструментов, стеклянной и металлической посуды, резиновых трубок и т. д.

Стерилизацию кипячением обычно производят в стерилизаторе — металлической коробке прямоугольной формы с плотно закрывающейся крышкой. Стерилизуемый материал помещают на имеющуюся в стерилизаторе сетку и заливают водой. Для повышения точки кипения и устранения жесткости воды добавляют 1—2% соды (лучше пользоваться дистиллированной водой). Стерилизатор закрывают крышкой и подогревают. Началом стерилизации считается момент закипания воды, кипятят в течение 15—30 минут. По окончании стерилизации сетку с инструментами извлекают за боковые ручки специальными крючками, а находящиеся в ней инструменты берут стерильным пинцетом или корнцангом, который кипятят вместе с остальными инструментами.

Стерилизацию паром производят двумя способами: 1) паром под давлением; 2) текучим паром.

Стерилизацию **паром под давлением** производят в автоклаве. Этот способ стерилизации основан на воздействии на стерилизуемые материалы насыщенного водяного пара при давлении **выше** атмосферного. В результате такой стерилизации при однократной обработке погибают как вегетативные, так и споровые формы микроорганизмов.

Автоклав (рис. 7) — массивный котел, снаружи обшитый металлическим кожухом, герметически закрыт крышкой, которая плотно привинчивается к котлу откидывающимися болтами с барашками. В наружный котел вставлен другой, меньшего диаметра, который называют стерилизационной камерой. В эту камеру помещают предметы, подлежащие стерилизации. Между обоими котлами имеется свободное пространство, называемое водопаровой камерой. В эту камеру через воронку, укрепленную снаружи, наливают воду до определенного уровня, отмеченного на специальной водомерной трубке. При кипении воды в водопаровой камере образуется пар. Стерилизационная камера снабжена выпускным краном с предохранительным клапаном для выхода пара при повышении

давления сверх необходимого. Для определения давления, создающегося в стерилизационной камере, служит манометр. Нормальное атмосферное давление (760 мм рт. ст.) принимается за нуль. Между показаниями мано-

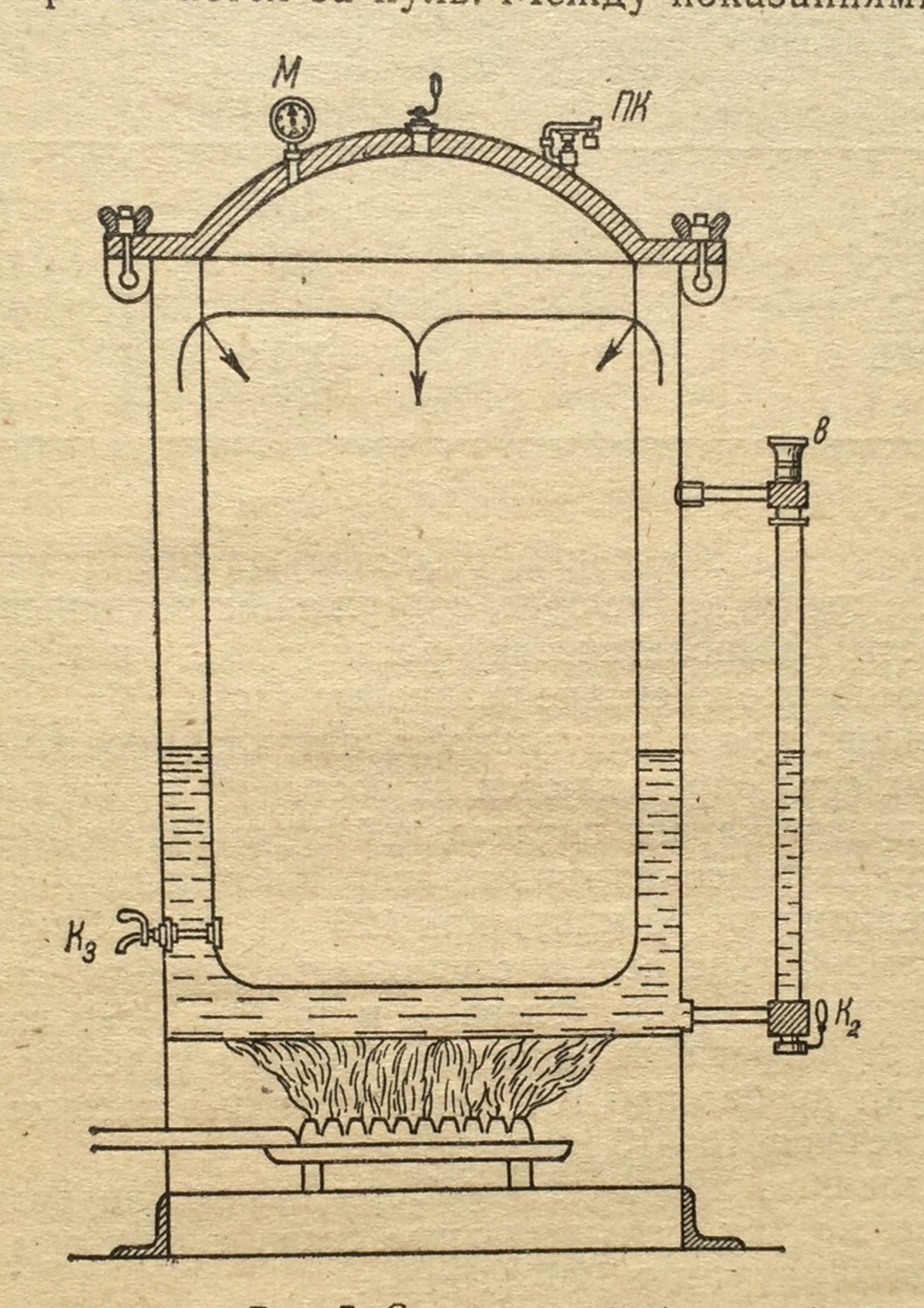


Рис. 7. Схема автоклава:

М — манометр; *ПК* — предохранительный клапан; *в* — воронка для воды; K_2 — кран для выпуска воды; K_3 — кран для выпуска пара.

метра и температурой имеется определенная зависимость (табл. 2).

В настоящее время имеются автоклавы с автоматическим регулированием режима работы. Кроме обычного манометра, они снабжены электроконтактным манометром, который препятствует увеличению давления выше заданной величины и тем самым обеспечивает постоянство нужной температуры в автоклаве.

Таблица 2

Режим работы автоклава

Показания манометра, атм	Температура кипения воды, °С	Показания манометра, атм	Температура кипения воды, °С
0	100	0,7	116
0,2	105	0,8	117
0,4	110	0,9	119
0,5	112	1,0	121
0,6	114	1,5	127
		2,0	134

Паром под давлением стерилизуют различные питательные среды, кроме сред, содержащих нативный белок; жидкости (физиологический раствор, воду и т. д.); приборы, особенно имеющие резиновые части.

Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются их составом и указаны в рецепте приготовления питательной среды. Например, простые среды (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон) стерилизуют 20 минут при 120° (1 атм). Однако при этой температуре нельзя стерилизовать среды, содержащие нативные белки, углеводы и другие легко изменяющиеся от нагревания вещества. Среды с углеводами стерилизуют дробно при 100° (стр. 37) или в автоклаве при 112° в течение 10—15 минут.

Различные жидкости, приборы, имеющие резиновые шланги, пробки, бактериальные свечи и фильтры стерилизуют 20 минут при 120° (1 атм).

В автоклавах производят также обезвреживание инфицированного материала. Чашки и пробирки, содержащие культуры микробов, помещают в специальные металлические ведра или баки с отверстиями в крышке для проникновения пара и стерилизуют в автоклаве при 126° (1,5 атм) в течение часа. Таким же образом стерилизуют инструменты после работы с бактериями, образующими споры.

К работе с автоклавом допускаются только специально подготовленные лица, которые должны строго и точно выполнять правила, указанные в инструкции, прилагаемой к аппарату.

1. Перед работой проверяют исправность всех частей и притертость кранов.

2. Через воронку, укрепленную снаружи котла, до верхней метки водомерного стекла заливают воду (дистиллированную или кипяченую, чтобы не образовалась накипь). Кран под воронкой закрывают.

3. В стерилизационную камеру на специальную сетку помещают стерилизуемый материал. Предметы следует загружать не слишком плотно, так как пар должен свободно проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными.

4. Крышку закрывают и болтами привинчивают к корпусу автоклава, причем болты закручивают попарно крест-накрест.

5. Открывают до отказа выпускной кран, соединяющий стерилизационную камеру с наружным воздухом, и начинают нагревать автоклав. Нагревание автоклава обычно производят с помощью газа или электричества.

При нагревании автоклава вода закипает, образующийся пар поднимается между стенками котлов и сквозь специальные отверстия, имеющиеся в стенке внутреннего котла (см. рис. 7), попадает в стерилизационную камеру и выходит через открытый выпускной кран. Сначала пар выходит вместе с воздухом, находящимся в автоклаве (влажный пар). Воздух из автоклава необходимо удалить, так как при одном и том же давлении температура сухого пара выше, чем смеси пара и воздуха. По мере наполнения автоклава паром вытесняется весь воздух и тогда сухой пар сильной непрерывной струей со свистом начинает выходить через выпускной кран. После этого кран закрывают, и давление в автоклаве начинает постепенно повышаться.

6. Началом стерилизации считают момент, когда показания манометра достигают заданной величины. Нагрев регулируют так, чтобы давление в автоклаве в течение определенного времени оставалось на одном уровне.

7. По истечении времени стерилизации нагрев автоклава прекращают, пар выпускают через специальный кран. Когда стрелка манометра опускается до нуля, паровой кран закрывают и открывают крышку. Чтобы избежать ожогов паром, оставшимся в автоклаве, крышку следует открывать на себя. Уровень температуры в ав-

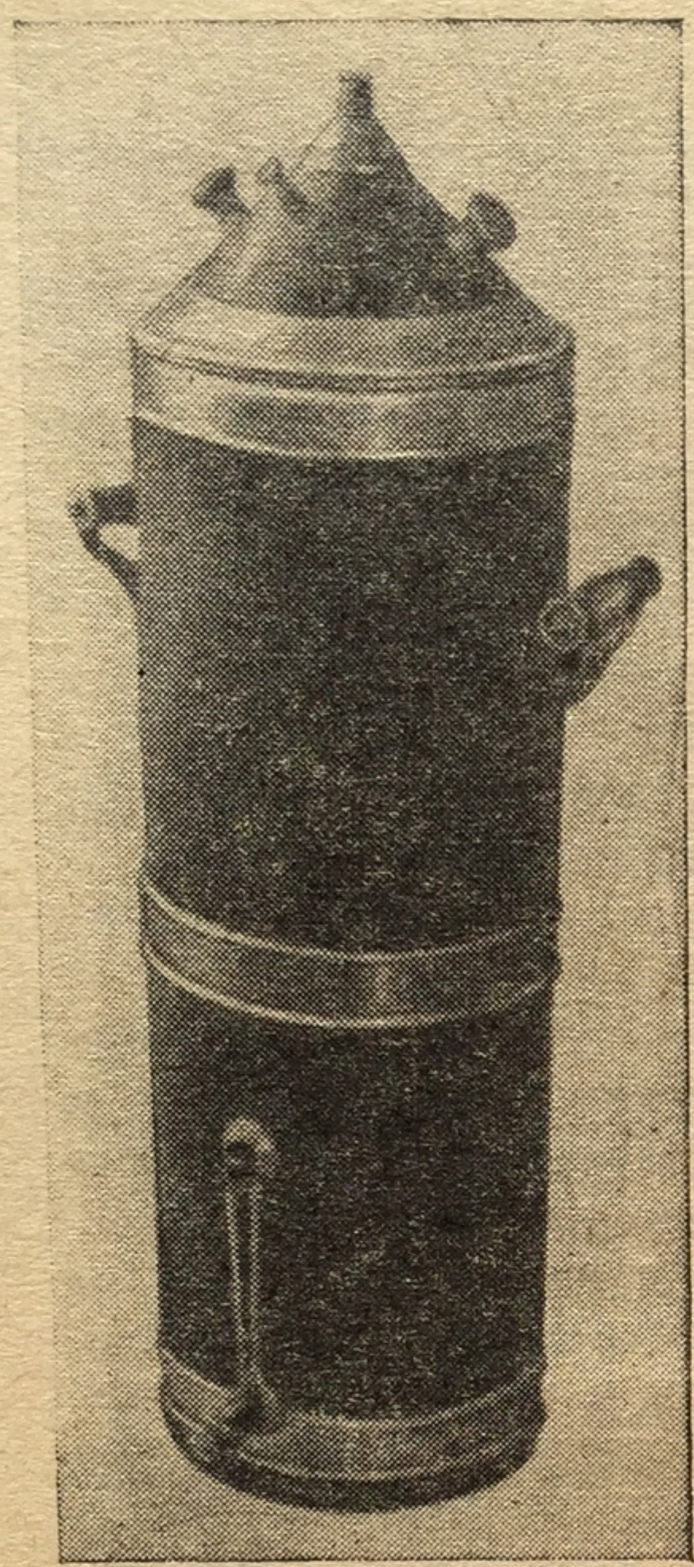


Рис. 8. Аппарат Коха для стерилизации текучим паром.

токлаве, т. е. правильность показаний манометра, можно проверить. Для этого используют различные вещества, имеющие определенную точку плавления: антипирин (113°), резорцин и серу (119°), бензойную кислоту (120°). Одно из этих веществ смешивают с ничтожно малым количеством краски фуксина или метиленового синего и насыпают в стеклянную трубочку, которую запаивают и помещают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. Если температура достаточна, вещество расплавится и окрасится в цвет соответствующей краски.

Для проверки эффективности стерилизации в автоклав помещают пробирку с заведомо споровой культурой. После автоклавирования пробирку переносят в термостат на 24—48 часов, отмечают отсутствие или наличие роста. Отсутствие роста свидетельствует о правильной работе прибора.

Стерилизацию **текучим паром** производят в аппарате Коха. Этот способ применяют в тех случаях, когда стерилизуемый объект изменяется при температуре выше 100°. Текучим паром стерилизуют питательные среды, содержащие мочевину, углеводы, молоко, картофель, желатину и др.

Аппарат Коха, или кипятильник Коха (рис. 8), представляет собой металлический цилиндр, обшитый снаружи (для уменьшения теплоотдачи) войлоком или асбестом. Цилиндр закрывают конической крышкой с отверстием для выхода пара. Внутри цилиндра находится подставка, до уровня которой наливают воду. На подставку ставят ведро с отверстиями, в которое помещают стерилизуемый материал. Нагревают аппарат Коха при помощи газа или электричества. Отсчет времени стерилизации

ведут с момента энергичного выделения пара у краев крышки и из отверстия для выхода пара. Стерилизуют в течение 30—60 минут. По окончании стерилизации нагрев прекращают. Вынимают из аппарата ведро с материалом и оставляют при комнатной температуре до следующего дня. Прогревание проводят 3 дня подряд при температуре 100° по 30—60 минут. Такой метод носит название дробной стерилизации. При первом прогревании гибнут вегетативные формы микробов, а споровые сохраняются. За сутки споры успевают прорасти и превращаются в вегетативные формы, которые погибают на второй день стерилизации. Так как возможно, что некоторая часть спор не успела прорасти, материал выдерживают еще 24 часа, а затем проводят третью стерилизацию. Стерилизация текучим паром в аппарате Коха не требует специального контроля, так как показателем правильной работы прибора служит стерильность приготовленных питательных сред. Стерилизовать текучим паром можно также в автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране.

Контрольные вопросы

1. Какие питательные среды стерилизуют паром?
2. Что такое стерилизатор и как он устроен?
3. Почему при стерилизации кипячением лучше применять дистиллированную воду?
4. Опишите устройство и режим работы автоклава.
5. Что стерилизуют в автоклаве?
6. Что служит контролем правильной стерилизации при автоклавировании?
7. Что такое стерилизация текучим паром?
8. Опишите устройство аппарата Коха.
9. С какой целью проводится дробная стерилизация?

Задание. Заполните форму № 5, указав режим стерилизации в автоклаве для каждого вида материала.

Форма № 5

Стерилизуемый материал	Условия стерилизации		
	давление	температура	время
Питательные среды			
Отработанные культуры			

Дробную стерилизацию можно проводить также в свертывателе Коха.

Свертыватель Коха используют для свертывания сывороточных и яичных питательных сред, причем одновременно с уплотнением среды происходит ее стерилизация.

Свертыватель Коха (рис. 9) представляет собой плоский металлический ящик с двойными стенками, покрытый снаружи теплоизоляционным материалом. В пространство между стенками через специальное отверстие, находящееся в верхней части наружной стенки, наливают воду. Отверстие закрывают пробкой, в которую вставлен термометр. Закрывают аппарат двумя крышками: стеклянной и металлической. Через стеклянную крышку можно наблюдать за процессом свертывания. Пробирки со средами укладывают на дно свертывателя в наклонном положении.

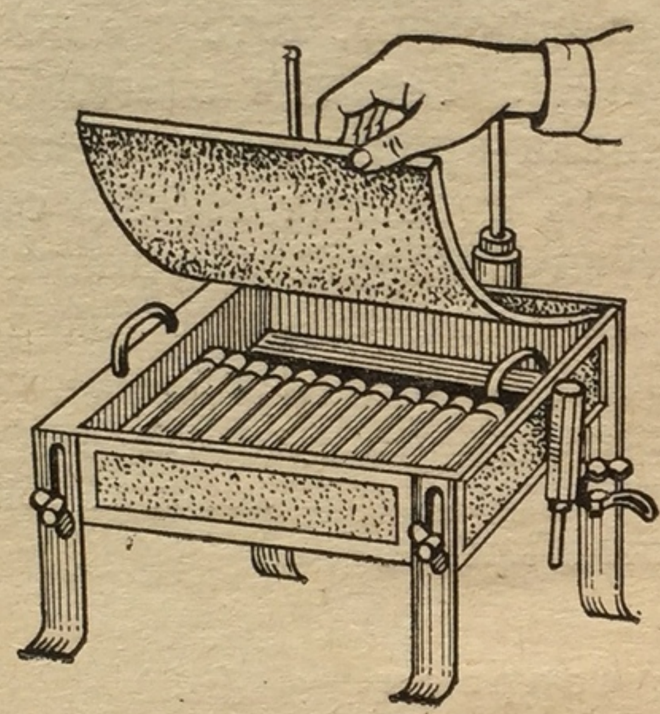


Рис. 9. Свертыватель Коха.

Нагревание свертывателя осуществляют с помощью газа или электричества. Среды стерилизуют однократно при температуре 90° в течение часа или дробно — 3 дня подряд при 80° в течение часа.

Тиндализацию[1] — дробную стерилизацию при низких температурах — применяют для веществ, которые легко разрушаются и денатурируются при температуре 60° (например, белковые жидкости). Прогревание стерилизуемого материала производят на водяной бане или в специальных приборах с терморегуляторами при температуре 56—58° в течение часа 5 дней подряд.

Контрольные вопросы

1. Каково назначение свертывателя Коха?
2. Каково устройство свертывателя Коха?
3. Какие существуют способы стерилизации в свертывателе?
4. Что такое тиндализация?

---

[1] Способ стерилизации назван по имени Тиндаля, предложившего его.

Стерилизация ультрафиолетовым облучением

Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами производят при помощи специальных установок — бактерицидных ламп. Ультрафиолетовые лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызвать гибель не только вегетативных клеток, но и спор. Ультрафиолетовое облучение применяют для стерилизации воздуха в больницах, операционных, детских учреждениях и т. д. В микробиологической лаборатории ультрафиолетовыми лучами облучают бокс перед работой.

Контрольные вопросы

1. Какими свойствами обладают ультрафиолетовые лучи?
2. В каких случаях прибегают к стерилизации методом ультрафиолетового облучения?

Механическая стерилизация при помощи бактериальных фильтров

Стерилизацию фильтрованием применяют в тех случаях, когда стерилизуемые предметы изменяются при нагревании. Фильтрование проводят с помощью бактериальных фильтров, изготовленных из различных мелкопористых материалов. Поры фильтров должны быть достаточно мелкими (до 1 мк), чтобы обеспечить механическую задержку бактерий. Поэтому некоторые авторы относят фильтрование к механическим способам стерилизации.

Методом фильтрования стерилизуют питательные среды, содержащие белок, сыворотки, некоторые антибиотики, а также отделяют бактерии от вирусов, фагов и экзотоксинов.

В микробиологической практике используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные фильтры и фильтры (свечи) Шамберлана и Беркефельда.

Фильтры Зейтца — это диски, изготовленные из смеси асбеста с целлюлозой. Толщина их 3—5 мм, диаметр 35—140 мм. Отечественная промышленность изготовляет фильтры двух марок: «Ф» (фильтрующие) — задерживающие взвешенные частицы, но пропускающие бактерии; «СФ» (стерилизующие) — с меньшими порами, задерживающие бактерии, но пропускающие вирусы.

Мятые асбестовые пластинки, а также с надломами и трещинами для работы непригодны.

Мембранные фильтры готовят из нитроцеллюлозы. Они представляют собой диски белого цвета толщиной 0,1 мм и диаметром 35 мм. В зависимости от размера пор они обозначаются №№ 1, 2, 3, 4 и 5 (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика мембранных фильтров

Номер фильтра	Средний диаметр пор, мк
1	0,35
2	0,5
3	0,7
4	0,9
5	1,2

Для стерилизации наиболее пригоден фильтр № 1. Кроме перечисленных, выпускают еще так называемый предварительный фильтр, предназначенный для освобождения фильтруемой жидкости от содержащихся в ней крупных частиц.

Фильтры (свечи) Шамберлана и Беркефельда представляют собой полые цилиндры, закрытые с одного конца. Свечи Шамберлана изготовляют из каолина с примесью песка и кварца. Стандартизуют их по размерам пор и обозначают: L_1, L_2, L_3, . . . L_{13}. Фильтры (свечи) Беркефельда готовят из инфузорной земли, по величине пор их обозначают V, N, W, что соответствует диаметру пор 3—4, 4—7, 8—12 мк.

Работу с бактериальными фильтрами осуществляют следующим образом. Фильтр должен быть закреплен в специальном держателе, который вставляют в приемник фильтра. Приемником обычно является колба Бунзена. Держатели, в большинстве случаев сделанные из нержавеющей стали, состоят из двух частей: верхней, имеющей форму цилиндра без дна, и нижней — опорной части, заканчивающейся трубкой. Фильтры Зейтца шероховатой поверхностью кверху помещают на металлическую сетку и крепко зажимают винтами между верхней и нижней частью держателя. Смонтированный фильтр укрепляют в резиновой пробке, вставленной в горлышко колбы Бун-

зена. В отводную трубку колбы, которую присоединяют к вакуумному насосу, вставляют ватный тампон. Подготовленную установку обертывают бумагой и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм в течение 20—30 минут. Весь прибор в собранном виде называют также фильтром Зейтца (рис. 10).

Через мелкопористые фильтры жидкости проходят медленно, поэтому фильтрование форсируют путем откачивания воздуха с помощью водоструйного, масляного или велосипедного насоса. Непосредственно перед работой отводной конец колбы соединяют резиновой трубкой с насосом. Места соединения различных частей заливают парафином для создания герметичности. В цилиндр аппарата наливают фильтруемую жидкость и включают в действие насос, создающий вакуум в приемнике. В результате образующейся разности давлений фильтруемая жидкость проходит через поры фильтра в приемник, а микробы остаются на поверхности фильтра.

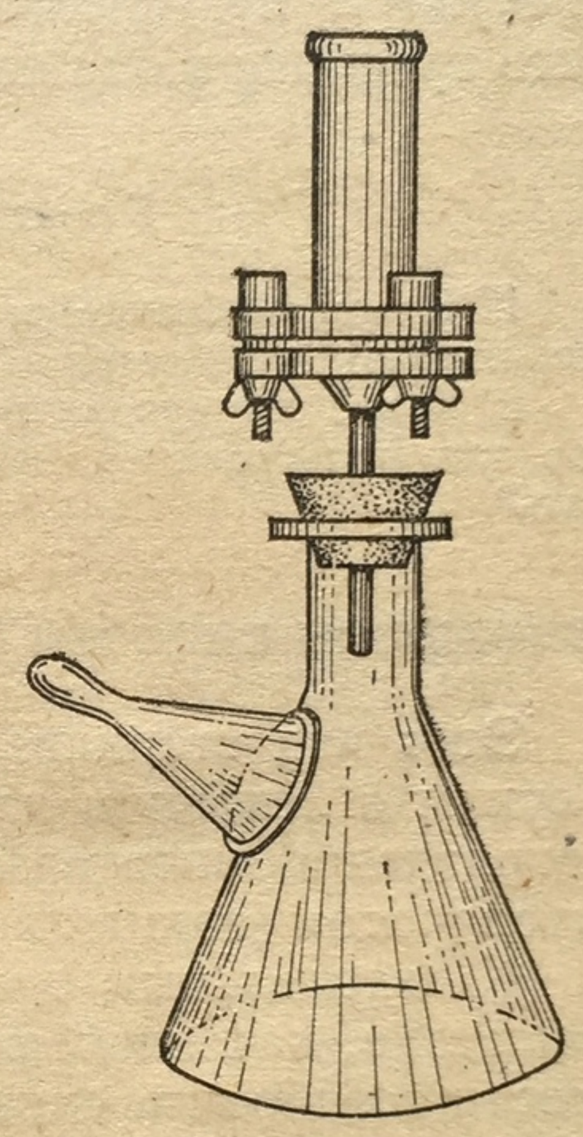


Рис. 10. Фильтр Зейтца.

Мембранные фильтры перед употреблением стерилизуют кипячением в дистиллированной воде. Чтобы предупредить скручивание фильтров, их сначала помещают в дистиллированную воду, подогретую до температуры 50—60°, и кипятят на слабом огне 30 минут, 2—3 раза меняя воду. Держатель и приемник фильтрата стерилизуют заранее, прибор монтируют в асептических условиях. Чтобы не порвать мембранный фильтр о металлическую сетку, под него кладут кружки стерильной фильтровальной бумаги. Затем стерильным пинцетом с гладкими кончиками берут мембранный фильтр из стерилизатора и помещают на опорную сетку блестящей поверхностью вниз.

Простерилизованные в автоклаве свечи (Шамберлана) соединяют посредством резиновой трубки с приемником и опускают в фильтруемую жидкость. Фильтрация происходит при помощи вакуумного насоса. В прием-

ник поступает стерильный фильтрат, а бактерии задерживаются порами свечи.

Мембранные и асбестовые фильтры рассчитаны на одноразовое использование. Свечи после употребления кипятят в водопроводной воде, а затем прокаливают в муфельной печи. Перед последующим употреблением свечи проверяют на целостность. Свечу опускают в сосуд с водой и пропускают воздух. Если на поверхности свечи выступают пузырьки воздуха, значит в свече образовались трещины и она непригодна.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается метод стерилизации фильтрованием? Что стерилизуют этим методом?
2. Какие бактериальные фильтры вы знаете? Как монтируют прибор для фильтрования, какие условия при этом необходимо соблюдать?

ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Этот вид стерилизации применяют ограниченно и он служит в основном для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред и иммунобиологических препаратов (вакцин и сывороток).

К питательным средам чаще всего прибавляют такие вещества, как хлороформ, толуол, эфир. При необходимости освободить среду от этих консервантов ее нагревают на водяной бане при температуре 56° (консерванты испаряются).

Для консервирования вакцин, сывороток пользуются мертиолатом, борной кислотой, формалином и т. д.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Биологическая стерилизация основана на применении антибиотиков. Этот метод используют при культивировании вирусов.

Контрольные вопросы

1. Что такое химическая стерилизация и когда ее используют?
2. Что такое биологическая стерилизация?

Основные способы стерилизации представлены в табл. 4.

Таблица 4

Основные способы стерилизации

Стерилизация					
физическая				химическая	биологическая
термическая		лучевая	механическая		
сухой жар	влажный жар				
В пламени горелки (фламбирование) В печи Пастера	Кипячение [1] Автоклавирование Текучим паром в аппарате Коха В свертывателе Коха Тиндализация	Воздействие ультрафиолетовыми лучами	Фильтрация через бактериальные фильтры[2]	Применение антисептических веществ (мертиолат, хлороформ, формалин и т. д.)	Применение антибиотиков[2]

[1] Стерилизация неполная: в стерилизуемом материале сохраняются споры.
[2] Стерилизация неполная: в стерилизуемом материале сохраняются вирусы.

Глава 4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологическое исследование — это выращивание и изучение свойств чистых культур бактерий, состоящих из одного вида микроорганизмов.

Для получения чистой культуры бактерии обычно выращивают (культивируют) вне организма (in vitro) на особых субстратах, называемых питательными средами.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Цель занятий: познакомить учащихся с основными принципами приготовления питательных сред.

Питательные среды служат для выделения из исследуемого материала чистых культур микроорганизмов, для накопления, сохранения и изучения их свойств, получения вакцин, токсинов, антибиотиков. Таким образом, среды являются основой для бактериологической работы. От качества среды нередко зависит результат всего исследования.

Среды служат для микроорганизмов местом обитания и источником питательных веществ. В средах микроорганизмы осуществляют все обменные процессы, растут, размножаются, погибают.

Требования, предъявляемые к средам для культивирования

1. Среды должны быть питательными, т. е. должны содержать вещества, необходимые для построения микробной клетки, а также источники энергии. В состав сред входят **органогены** (азот, углевод, кислород, водород); **соли**: (натрия, калия, кальция, фосфора и т. д.); **микроэлементы** (железо, молибден, барий, хром, цинк, медь, марганец, литий и др.) и **факторы роста** (витамины, гормоны и т. д.).

Все перечисленные вещества должны находиться в среде в легкоусвояемом для данного микроба виде.

2. Среды должны иметь определенную концентрацию водородных ионов, для измерения которой служит водородный показатель — pH. Для большинства патогенных микробов оптимальным (т. е. обеспечивающим наилучшие условия развития) является слабо щелочной pH 7,2—7,4. Исключение составляют холерный вибрион — для него оптимум находится в щелочной зоне (pH 8,0—8,6) и туберкулезная палочка, нуждающаяся в слабокислом pH (6,2—6,8).

Чтобы во время роста микробов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменяли оптимальный pH, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, способные нейтрализовать кислые или щелочные продукты обмена.

3. Среды должны быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов это соответствует 0,5% NaCl.

4. Среды должны быть влажными и не слишком вязкими, так как питание микробов осуществляется за счет осмоса и диффузии.

5. Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. определенным соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны. Этот потенциал выражают через индекс rH_2, который показывает насыщение среды

кислородом. Для одних мкробов необходим высокий окислительный потенциал, для других — низкий. Например, анаэробные микроорганизмы могут размножаться при rH_2 не выше 5, а аэробы — при rH_2 не ниже 10.

6. Среды должны быть стерильными, так как наличие в среде посторонних микроорганизмов препятствует росту изучаемого микроорганизма и определению его свойств. Кроме того, нестерильные среды быстро изменяют свои свойства (состав, pH и т. д.). Режим стерилизации зависит от состава сред и указан в их рецепте.

7. Среды должны быть по возможности унифицированными, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, в средах для культивирования большинства патогенных микроорганизмов количество аминного азота (NH_2), т. е. суммарного азота аминогрупп, аминокислот и низших полипептидов, должно составлять 80—120 мг%, общего азота (N) 250—300 мг%; хлоридов (в пересчете на NaCl) 0,5—0,8%; пептона 1,0%.

Контрольные вопросы

1. Для чего служат питательные среды?
2. Какие вещества необходимы для роста и размножения микроорганизмов?
3. В каком состоянии должны быть питательные вещества, чтобы микроорганизмы могли их усвоить?
4. Перечислите требования, которым должны удовлетворять питательные среды.

Классификация сред

А. По основным **исходным компонентам** различают два типа сред.

Естественные среды, т. е. среды из природных продуктов животного или растительного происхождения (мяса, молока, яиц, картофеля, сои, кукурузы, дрожжей и т. д.). Несмотря на то что состав природных сред очень сложен и меняется в зависимости от исходного сырья, эти среды нашли широкое применение в практике.

Синтетические среды готовят из химически чистых органических и неорганических солей, аминокислот и факторов роста (витаминов), растворяя их в дважды дистиллированной воде. Они стандартнее и проще в приготовлении.

Б. **Консистенция** сред различна. Они могут быть жидкими, плотными и полужидкими. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких, прибавляя к ним клеевые вещества — обычно агар-агар или желатин.

Агар-агар — это полисахарид, полученный из определенных сортов морских водорослей. Он не является питательным веществом для микробов и служит только для уплотнения среды. В воде агар плавится при температуре 80—100°, застывает при 40—45°.

Желатин — белок животного происхождения. Водные растворы желатина плавятся при температуре 30—34°, при более низкой температуре они превращаются в желе. Из-за низкой температуры плавления желатиновых сред культивирование на них производят при комнатной температуре. Некоторые микробы используют желатин как питательное вещество; при росте этих микробов среда разжижается. Кроме агаровых и желатиновых, в качестве плотных сред применяют картофель, свернутую сыворотку крови и свернутые яйца.

В. **По составу** среды бывают простыми и сложными. К первым относятся мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонная вода.

Простые среды используют для выращивания большинства микроорганизмов и в качестве основы для приготовления сложных сред, прибавляя к ним различные сахара, кровь, сыворотку, молоко, витамины и другие ингредиенты, необходимые для роста и жизнедеятельности того или иного вида микроорганизмов.

Г. По **назначению**, помимо простых (общеупотребительных) сред, различают следующие.

Специальные среды, которые служат для выделения и выращивания микробов, не растущих на простых средах. Например, для выращивания стрептококка к средам прибавляют сахар; для выращивания пневмо- и менингококков — сыворотку крови, возбудителя коклюша — кровь.

Элективные, или избирательные, среды служат для выделения определенного вида микробов, так как такие среды обеспечивают благоприятные условия для роста микроорганизмов, подлежащих выделению. При этом рост сопутствующих микробов задерживается или вовсе не происходит. Например, свернутая лошади-

ная сыворотка элективна для дифтерийной палочки; среды с определенным содержанием пенициллина — для возбудителей коклюша и других устойчивых к пенициллину микробов. Некоторые среды становятся элективными при добавлении к ним определенных количеств красок, солей и т. д.

Жидкие элективные среды называются средами накопления. Примером среды накопления может служить пептонная вода с pH 8,0. На ней активно размножается холерный вибрион, в то время как другие микробы не развиваются.

Дифференциально-диагностические среды позволяют отличать (дифференцировать) один вид микробов от другого по характеру их ферментативной активности.

Консервирующие среды применяют для первичного посева и транспортировки материала. Они предотвращают отмирание патогенных микроорганизмов и подавляют развитие сапрофитов. К этим средам относится глицериновая смесь, которую используют при сборе и транспортировке испражнений, исследуемых на кишечную группу микробов.

Рецепты приготовления некоторых сред приведены в конце следующего раздела.

Контрольные вопросы

1. Как классифицируют среды по консистенции?
2. Какие вещества применяют для уплотнения сред?
3. Какие среды относят к простым или общеупотребительным?
4. Для чего применяют простые среды?
5. Какие среды называют сложными? Для чего их используют? Что служит основой для их приготовления?
6. На каких средах можно получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении других?
7. Как называют среды, на которых изучают ферментативную активность микробов?
8. Какие среды применяют для первичного забора материала?
9. Заполните форму № 6. Укажите, на какие группы делят среды.

Форма № 6

Классификация питательных сред по			
происхождению	консистенции	составу	назначению

Приготовление сред

Посуда для приготовления сред. Посуда не должна содержать посторонних веществ, например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке ее в ржавых кастрюлях. Лучше всего пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой. Для приготовления больших количеств среды (десятков и сотен литров) используют специальные варочные котлы, или реакторы (рис. 11). Посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить. Новую стеклянную посуду предварительно кипятят в 1—2% растворе соляной кислоты в течение 30 минут или погружают в этот раствор на ночь, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.

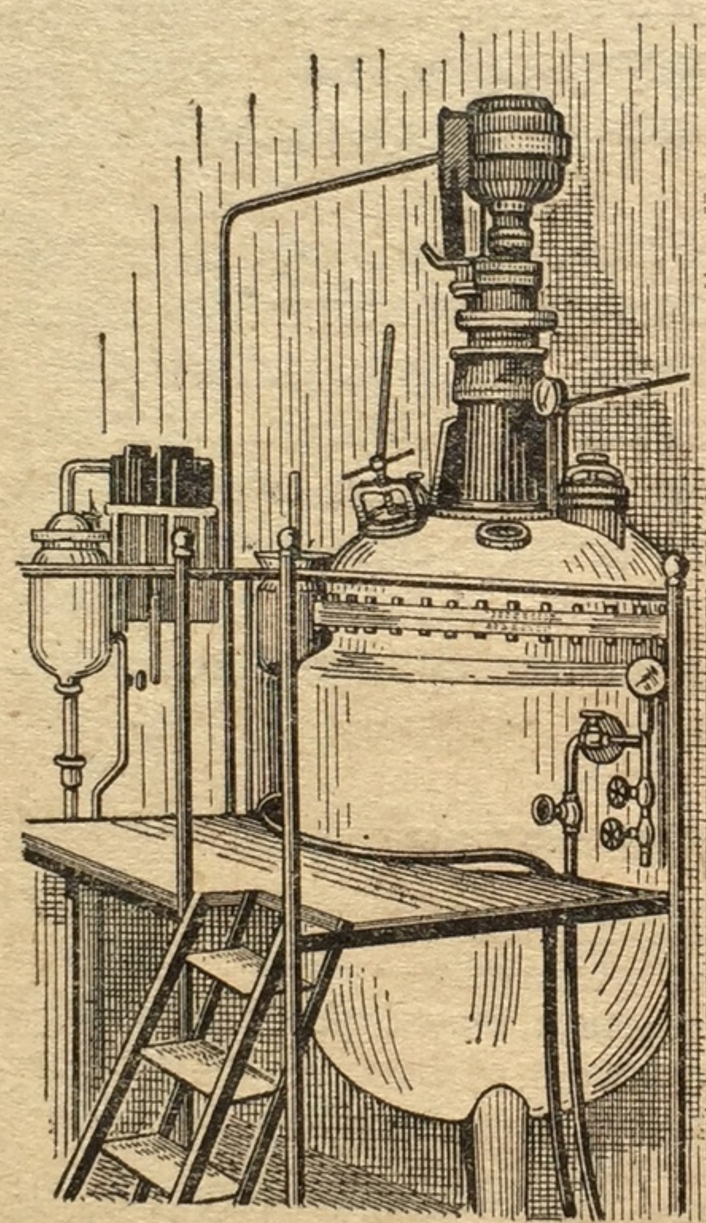


Рис. 11. Общий вид реактора.

Посуду для приготовления сред нельзя использовать для других целей, например для хранения дезинфицирующих растворов и химических реактивов, так как даже следы этих веществ могут препятствовать росту микробов, т. е. сделать среду непригодной для их культивирования.

Исходное сырье для приготовления сред. Исходным сырьем для приготовления большинства сред служат растительные и животные продукты. Чаще всего среды готовят из мяса, казеина и дрожжей.

Основные питательные бульоны готовят на мясной воде или на различных переварах, полученных при кислотном или ферментативном гидролизе исходного сырья. Под действием фермента пепсина получают так называемый перевар Мартена, фермента трипсина — перевар Хоттингера. Широко применяют перевары казеина, плаценты, сгустков крови, аутолизаты дрожжей.

Приготовление бульонов из переваров в 5—10 раз экономичнее, чем из мясной воды. Среды из переваров богаче аминокислотами, следовательно они питательнее, обладают большей буферностью и имеют более стабильный pH. Кроме того, для приготовления переваров можно использовать заменители мяса (сгустки крови, казеин и т. д.).

Мясная вода. Для приготовления мясной воды свежее мясо — говядину, телятину или конину — освобождают от костей, жира и сухожилий и пропускают через мясорубку или мелко нарезают. Мясо заливают двойным объемом водопроводной воды и оставляют на сутки в прохладном месте. За это время из мяса экстрагируются растворимые питательные вещества, соли, факторы роста. Настой отжимают через марлю, кипятят 5 минут на слабом огне, фильтруют через бумажный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Полученную прозрачную золотистую жидкость наливают в бутыли, закрывают ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120° (1 атм). При необходимости длительного хранения мясной воды на пробки надевают резиновые колпачки.

Перевар Хоттингера. Говяжье или конское мясо, освобожденное от жира и сухожилий, нарезают кусочками, заливают двойным количеством водопроводной воды и кипятят 5 минут. Мясо вынимают из отвара и пропускают через мясорубку. Смешивают фарш с отваром и дают остыть до 45°, после чего переливают в бутыль, куда добавляют 0,5% сухого панкреатина или 10% фарша поджелудочной железы, предварительно освобожденной от соединительной ткани и жира. После добавления фермента смесь подщелачивают 20% раствором питьевой соды до pH 8,0, встряхивают и добавляют 1—3% хлороформа. Бутыль плотно закрывают резиновой пробкой и помещают в термостат при температуре 37° на 10 суток. Время от времени бутыль встряхивают. При встряхивании следует слегка приоткрывать пробку для выхода паров хлороформа. После завершения процесса переваривания мясной фарш превращается в гомогенный сероватый осадок, над которым находится прозрачная золотистая жидкость. Готовый перевар проверяют на наличие триптофана по появлению в пробе перевара розовой окраски после добавления 1—2 капель бромной воды, фильтруют

через ватно-марлевый фильтр, наливают в бутыли, закрывают ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками и стерилизуют 20 минут при температуре 120° (1 атм). Перевар в бутылях с надетыми на пробки резиновыми колпачками можно сохранять впрок. Готовый перевар обычно содержит от 600 до 900 мг% аминного азота.

Гидролизат казеина получают при действии на казеин трипсина. Такой гидролизат называется панкреа-

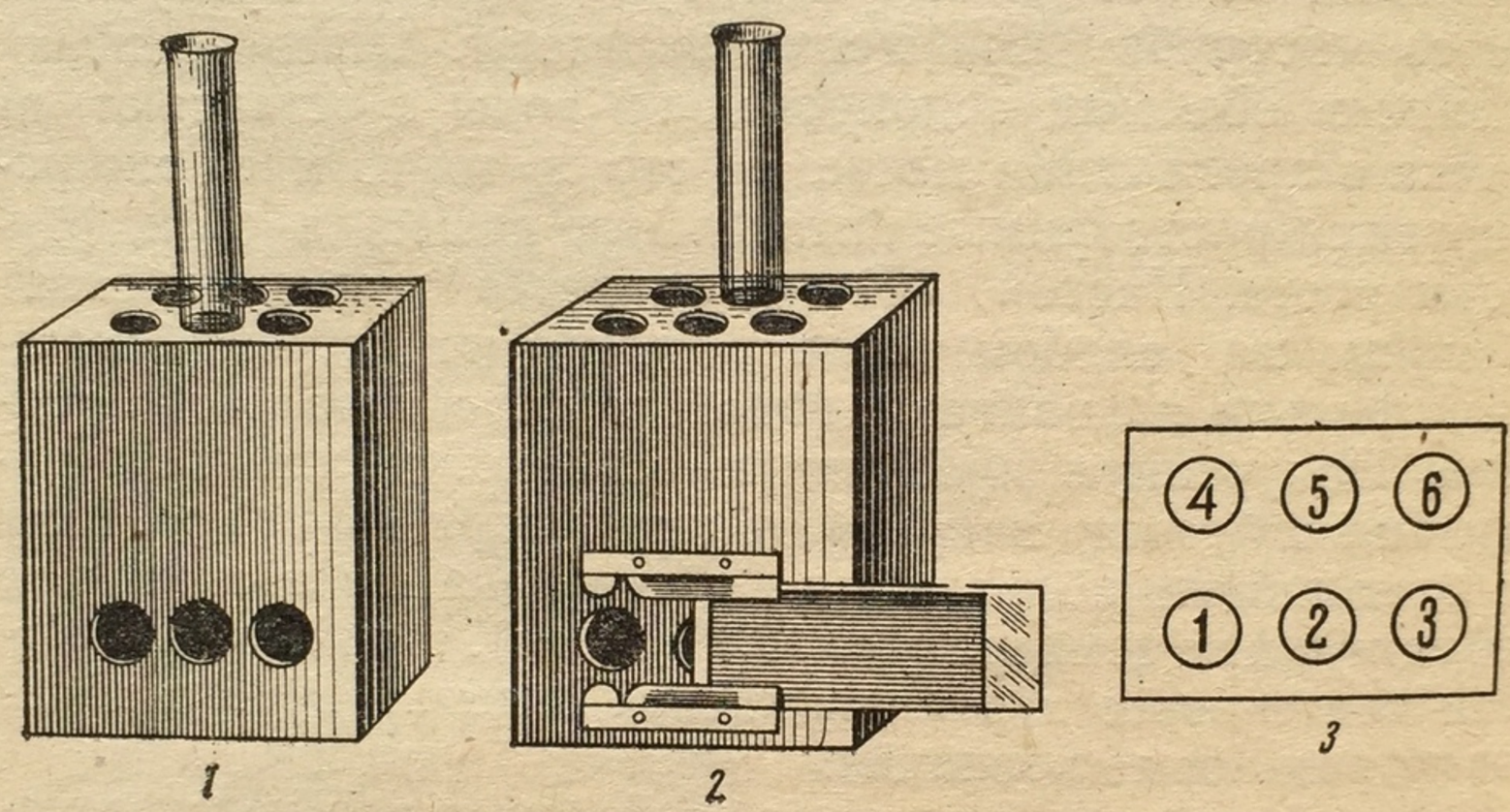


Рис. 12. Компаратор Михаэлиса.
1 — вид спереди; *2* — вид сзади; *3* — схема расположения пробирок в компараторе.

тическим. Кислотный гидролизат казеина получают под действием соляной кислоты.

Этапы приготовления сред: 1) варка; 2) установление оптимального pH; 3) осветление; 4) фильтрация; 5) разлив; 6) стерилизация; 7) контроль стерильности, химического состава, биологический.

1. Варка. Среды варят на открытом огне, на водяной бане, в автоклаве или в специальных котлах, подогреваемых паром.

2. Установление оптимального pH среды производят с помощью потенциометра или компаратора Михаэлиса. Компаратор состоит из деревянного штатива с гнездами для пробирок (рис. 12) и набора стандартных пробирок определенного pH. При приготовлении сред пользуются обычно индикатором мета-нитрофенолом, изменяющим свой цвет в диапазоне pH 6,8—8,4.

pH определяют следующим образом: берут 4 пробирки, диаметр которых равен диаметру стандартных. В пробирки 1, 2 и 3 (рис. 12, 3) наливают по 2 мл охлажденной испытуемой среды. В пробирки 1 и 3 наливают по 5 мл дистиллированной воды, во вторую — 4 мл воды и 1 мл индикатора. В пробирку 5 наливают 7 мл дистиллированной воды. Пробирки устанавливают в соответствующие гнезда штатива. В гнезда 4 и 6 помещают пробирки со стандартными растворами нужного pH.

Цвет жидкостей в пробирках сравнивают в проходящем свете, закрыв заднюю прорезь прибора фильтром (матовым или синим, если жидкости интенсивно желтые). pH испытуемого раствора соответствует pH того стандарта, с цветом которого совпадает его цвет.

При приготовлении сред с определенным pH в гнезда 4 и 6 ставят пробирки со стандартными растворами, pH которых близок к требуемому. Затем в пробирку 2, содержащую испытуемую среду и индикатор, добавляют из бюретки определенное количество щелочи (или кислоты) до тех пор, пока цвет жидкости не совпадет с цветом стандарта. Количество щелочи (или кислоты), прибавленное к 2 мл среды в пробирке 2, пересчитывают на весь объем приготовленной среды. Например, если для получения нужного pH на 2 мл среды пошло 6 капель (0,3 мл) N/20 раствора щелочи, то для подщелачивания 1 л среды нужно в 500 раз больше, т. е. 150 мл N/20 или 7,5 мл нормального раствора щелочи.

Необходимо иметь в виду, что при стерилизации pH сред снижается на 0,2. Поэтому для получения сред с pH 7,2—7,4 их вначале готовят с pH 7,4—7,6.

3. Осветление сред производят в том случае, если они при варке мутнеют или темнеют. Для осветления среды белок куриного яйца взбивают с двойным количеством воды, вливают в среду при температуре 50°, перемешивают и кипятят. При этом белок, свертываясь, увлекает в осадок взвешенные в среде частицы. Вместо белка куриного яйца можно взять 20—30 мл сыворотки крови на 1 л среды.

4. Фильтрация. Жидкие и расплавленные желатиновые среды фильтруют через влажный бумажный фильтр или через матерчатые фильтры.

Фильтрация агаровых сред затруднена вследствие того, что они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр (в воронку помещают марле-

вую салфетку и на нее пышный кусок ваты). Можно фильтровать эти среды через матерчатые или бумажные фильтры, используя специальные воронки с подогревом, либо помещая их в горячий автоклав или аппарат Коха.

Фильтрацию агаровых сред можно заменить отстаиванием. Для этого среду помещают в высокий сосуд и расплавляют в автоклаве. При медленном остывании среды все взвешенные в ней частицы успевают осесть на дно. На следующий день агаровый сгусток извлекают из сосуда (для этого сосуд ненадолго помещают в горячую воду) и отрезают ножом нижнюю часть, в которой скопился осадок. Верхнюю прозрачную часть расплавляют и разливают в соответствующие емкости.

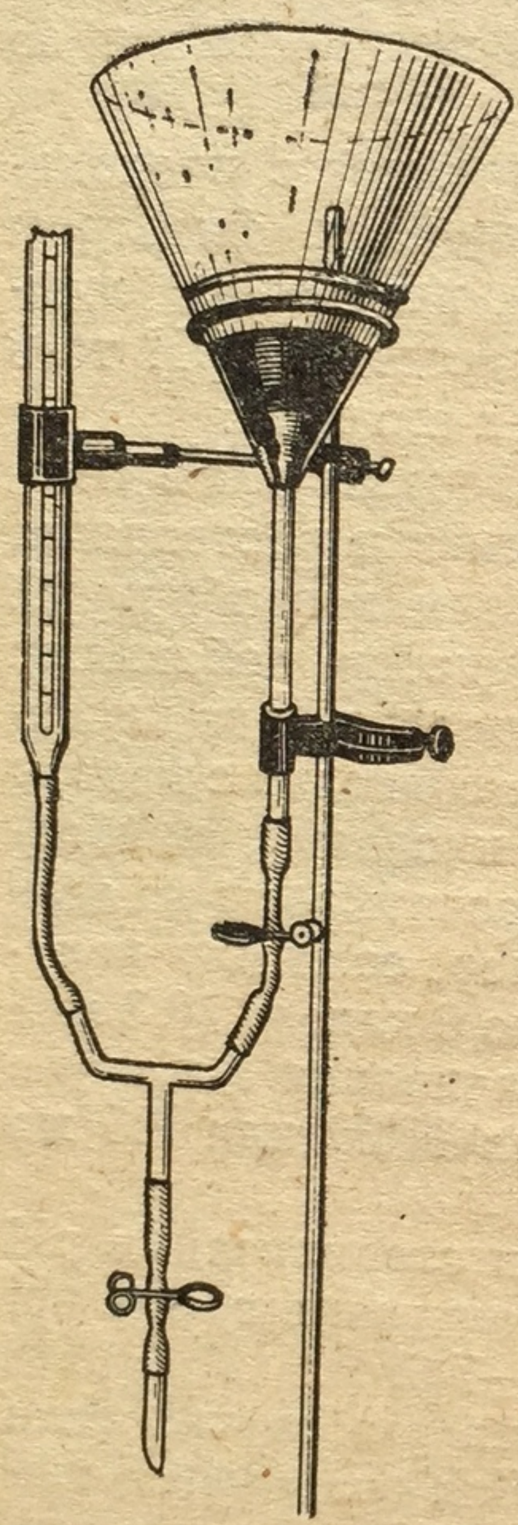


Рис. 13. Монтаж для мерного разлива сред.

5. Разлив. Приготовленные среды разливают (плотные среды перед этим растапливают) в пробирки по 3—5 мл или по 10 мл; во флаконы, колбы, матрацы и бутыли не более чем на $^2/_3$ их емкости, так как иначе при стерилизации сред могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

Среды, которые после разлива стерилизуют в автоклаве под давлением, разливают в чистую сухую и желательно стерильную посуду. Среды, стерилизуемые при более низкой температуре, разливать в стерильную посуду обязательно!

Разлив сред чаще всего производят с помощью воронки, на конец которой надета резиновая трубка с зажимом Мора. Для мерного разлива применяют мензурки, дозаторы, шприцы-пипетки, бюретки (рис. 13).

Посуду со средой обычно закрывают ватно-марлевыми пробками. При разливе следует следить, чтобы среда не смочила края посуды, иначе к ним могут прилипнуть пробки. Поверх пробок надевают бумажные колпачки.

Разлив агаровых сред в чашки Петри. Среды перед разливом растапливают на водяной бане и остужают до температуры 45—50°. Разлив среды производят в асептических условиях. Сосуд со средой берут в правую руку и, держа его у огня, левой рукой вынимают пробку (зажав ее мизинцем). Обжигают горлышко сосуда, и, слегка приоткрыв левой рукой крышку чашки, вводят под нее горлышко, не прикасаясь им к краям чашки. В каждую чашку наливают 15—20 мл среды (слоем 2—3 мм), распределяя среду равномерно по дну чашки. Если при этом на поверхности среды образуются пузырьки воздуха, к ним подносят пламя горелки или спички еще до того, как среда застынет — пузыри исчезают. Затем крышку закрывают и дают среде застыть. Если посев производят в день разлива, среду необходимо подсушить. Для этого чашки в термостате осторожно открывают и устанавливают крышки и чашки дном вверх. Чашки выдерживают в термостате 20—30 минут. Если посев производят на следующий день после разлива, чашки после застывания среды, не подсушивая, завертывают в ту же бумагу, в которой их стерилизовали, и помещают в холодильник.

Приготовление скошенного агара. Пробирки с 4—5 мл стерильной расплавленной агаровой среды укладывают в наклонном положении (примерно под углом 20°) с таким расчетом, чтобы среда не заходила за $^2/_3$ высоты пробирки, иначе она может смочить пробку. После того как среда застынет, пробирки ставят вертикально и дают стечь воде (конденсату). Лучше всего употреблять свежескошенный агар. Пользоваться средой, в которой нет конденсата, нельзя. Такой агар можно снова растопить на водяной бане и скосить.

6. Стерилизация. Режим стерилизации зависит от состава среды и указан в ее рецепте. Примерная схема режимов стерилизации различных сред приведена в табл. 5.

Некоторые среды стерилизуют с помощью бактериальных фильтров. Это целесообразно при приготовлении сред с белком, сахарами и витаминами.

7. Контроль готовых сред. а) Контроль стерильности. Простерилизованные среды помещают в термостат при 37° на двое суток. Если жидкие среды останутся прозрачными, а на поверхности и в толще плотных сред не появится рост микробов, среды считают стерильными и передают для химического контроля.

Таблица 5

Схема режимов стерилизации сред

Среды	Режим стерилизации		
	аппарат	температура	время
Простые	Автоклав	120° (1 атм)	20 минут
С углеводами, молоком, желатином	Автоклав с незакрытой крышкой или аппарат Коха	100° (текучий пар)	30—60 минут 3 дня подряд (дробная стерилизация)
Белковые сывороточные и яичные (с уплотнением)	Свертыватель Коха	80—85°	1 час 3 дня подряд (дробная стерилизация)
		или	
		95°	1 час однократно
Белковые (без уплотнения)	Водяная баня	58°	1 час 3—4 дня подряд (дробная стерилизация)

б) Химический контроль. Отбирают несколько образцов каждой серии среды. В пробах определяют pH наиболее точным способом — с помощью потенциометра. Кроме того, в среде определяют содержание общего и аминного азота, пептона и хлоридов. Их количество должно соответствовать указанному в рецепте.

в) Для биологического контроля несколько образцов среды засевают лабораторной культурой того микроба, для которого приготовлена среда, и изучают характер его роста.

Среды, успешно выдержавшие контроль, используют для культивирования микробов. К каждой серии среды прилагают этикетку и специальный паспорт.

Примерная форма паспорта на питательные среды

Паспорт № (по журналу выдачи сред)

1. Наименование среды.
2. Объем среды (в мл).
3. Режим стерилизации.
4. Дата приготовления.
5. Стерильность через 48 часов при температуре 37°.

6. pH среды после стерилизации.
7. Состав среды (содержание компонентов в 1 л).
8. Результаты биологического контроля.

Приготовил . . . . Проверил . . . .

Приготовление общеупотребительных (простых) сред

Мясо-пептонный бульон (МПБ). К мясной воде прибавляют 1% сухого пептона и 0,5% химически чистого хлористого натрия. Полученную смесь кипятят на слабом огне 10—15 минут для растворения веществ, устанавливают нужный pH и снова кипятят 30—40 минут до выпадения осадка. Фильтруют, доливают водой до первоначального объема и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120°.

Бульон Хоттингера. Перевар Хоттингера разводят дистиллированной водой в 5—6 раз. Степень разведения перевара зависит от количества аминного азота, содержащегося в переваре, и того количества аминного азота, которое должно быть в готовой среде (указано в рецепте среды). Например, если в переваре содержится 900 мг% аминного азота, а в среде должно быть 180 мг%, перевар надо развести в 5 раз. К разведенному перевару прибавляют 0,5% химически чистого хлористого натрия и кипятят на слабом огне до растворения соли. В остывшей среде устанавливают требуемый pH, фильтруют, разливают и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120°.

Мясо-пептонный агар (МПА). К готовому бульону добавляют 2—3% измельченного агар-агара и, все время помешивая, кипятят на медленном огне до его расплавления. МПА можно также варить в автоклаве или в аппарате Коха. Готовую среду, если нужно, осветляют, после чего фильтруют, разливают и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120°.

Полужидкую агаровую среду готовят, добавляя к основному бульону 0,2—0,5% агар-агара.

Агар Хоттингера готовят так же, как МПА, только в качестве основного бульона используют бульон на переваре Хоттингера.

Питательный желатин. К готовому бульону прибавляют 10% желатина. Среду подогревают до растворения желатина, фильтруют, разливают и стерилизуют в аппарате Коха при температуре 100° (текучим паром) дробно по 1 часу 3 дня подряд.

Пептонная вода. Готовят 1% раствор пептона на дистиллированной воде, добавлют 0,5% химически чистого хлористого натрия и подогревают до растворения. В остывшей среде устанавливают нужный pH, фильтруют, разливают и стерилизуют в автоклаве 20 минут при температуре 120°.

Приготовление сложных сред

Среды с сахарами и другими углеводами. К основному бульону или растопленному агару прибавляют нужное количество (0,1—1%) определенного сахара (например, глюкозы). Среду разливают в стерильную посуду и стерилизуют в аппарате Коха или в автоклаве с незакрытой крышкой (текучим паром). Лучше готовить среды с углеводами, добавляя к стерильным простым средам нужное количество 20—30% раствора углеводов, предварительно простерилизованного с помощью бактериальных фильтров.

Среды с кровью. Стерильную дефибринированную кровь в количестве 3—10% (обычно 5%) объема среды добавляют к стерильным простым средам в асептических условиях. Агаровые среды перед этим растапливают и остужают до 45°.

Среды с сывороткой крови. Эти среды готовят так же, как среды с кровью, добавляя к основным средам стерильную сыворотку крови, не содержащую консервирующих веществ, в количестве 10—20% объема среды. Сыворотку предварительно инактивируют при температуре 56° в течение 30 минут на водяной бане или в инактиваторе.

Среды с желчью. К простым средам добавляют желчь в количестве 10—40% объема среды, устанавливают нужный pH и стерилизуют в автоклаве при температуре 120° в течение 20 минут. Можно добавить стерильную желчь в асептических условиях.

Сухие среды

В настоящее время промышленность выпускает большой ассортимент сухих сред разного назначения (простых, элективных, дифференциально-диагностических и специальных: например, среды Гисса, среда Эндо и пр.). Это гигроскопические порошки, насыпанные во флаконы с завинчивающимися крышками. Сухие среды следует хранить в темном месте герметически закрытыми.

В лаборатории из порошков готовят среды по прописи, указанной на этикетке.

Преимуществом сухих сред является их стандартность, стабильность, простота приготовления. Поэтому они доступны для применения в любых лабораториях.

Контрольные вопросы

1. Что служит основным сырьем для приготовления сред?
2. Какой должна быть посуда, используемая для приготовления сред?
3. В чем преимущество переваров перед мясной водой?
4. Перечислите последовательно этапы приготовления сред.
5. Каким должен быть pH сред, применяемых для культивирования патогенных микробов? Каким должен быть pH этих сред перед стерилизацией и почему?
6. Какова температура плавления и застывания агаровых сред?
7. Как стерилизуют простые среды?
8. Как стерилизуют среды, содержащие сахара и другие углеводы?
9. Как должна быть приготовлена посуда, в которую разливают среды, содержащие углеводы и белок?
10. Как определяют правильность режима стерилизации сред?

Задание 1. Внесите в форму № 7 режимы стерилизации указанных в ней сред.

Форма № 7

Среда				
простая	с сахаром	с желатином	с молоком	с сывороткой крови

2. Приготовьте МПБ и МПА с pH 7,2—7,4 во флаконах и пробирках.
3. Приготовьте бульон и агар Хоттингера.
4. Приготовьте бульон с глюкозой (сахарный).
5. Приготовьте агар с кровью и разлейте его в чашки Петри.
6. Приготовьте из сухих порошков среды Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева и висмут-сульфит-агар.

МЕТОДЫ ПОСЕВА НА СРЕДЫ

Цель занятия: обучить учащихся основным методам посева микроорганизмов. В зависимости от характера посевного материала и среды существуют разные ме-

тоды посева. Все они преследуют одну цель: посеять материал так, чтобы из окружающей среды в него не попали посторонние микроорганизмы. Поэтому работать следует быстро, но без резких движений, чтобы не усилить движение воздуха. Во время посева нельзя разговаривать. Посевы лучше производить в боксе.

Посев из пробирки в пробирку. Пробирку с посевным материалом и пробирку со средой держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне, а их основания находились поверх кисти. В правой руке, как писчее перо, держат бактериальную петлю. Петлю вертикально прокаливают в пламени горелки (стерилизуют). Пробки из пробирок вынимают правой рукой, зажимая их между мизинцем и ладонью.

Извлекают пробки не рывком, а плавно — легкими винтовыми движениями. Вынув пробки, края пробирок сразу обжигают в пламени горелки. Прокаленную петлю вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом, охлаждают и, набрав небольшое количество посевного материала, осторожно переносят его в пробирку со средой.

При посеве на жидкую среду петлю слегка погружают в жидкость и растирают посевной материал на стенке пробирки, после чего смывают его средой.

При посеве на скошенный агар материал растирают на поверхности среды зигзагообразными движениями снизу вверх, начиная от границы конденсационной воды.

Если посев производят на агаровые или желатиновые среды, разлитые в пробирки столбиком, то петлей с посевным материалом прокалывают столбик до дна, производя так называемый посев уколом.

После посева петлю извлекают из пробирки, края пробирок обжигают и, проведя пробки через пламя горелки, пробирки закрывают, а петлю прокаливают.

Посев жидкого материала можно производить стерильными пастеровскими или градуированными пипетками.

Кроме того, для посева можно использовать тампон с исследуемым материалом. При посеве на жидкие среды тампон погружают в среду и несколько секунд споласкивают в ней. При посеве на плотные среды материал с тампона тщательно втирают в поверхность среды, вращая тампон.

Пересев на пробирки с чашки Петри. Чашку с посевным материалом ставят перед собой крышкой вверх. Большим и указательным пальцами левой руки слегка приоткрывают крышку и вводят под нее обожженную петлю. Набрав посевной материал, петлю вынимают из чашки и закрывают крышку. В левую руку берут пробирку со средой. Посев производят так же, как с пробирки на пробирку. После посева чашку поворачивают вверх дном.

Посев шпателем на чашки Петри с агаром. Шпатель — это стеклянная или металлическая палочка или трубка, конец которой загнут в виде треугольника. Левой рукой слегка приоткрывают крышку. Петлей, пипеткой или стеклянной палочкой наносят на поверхность среды посевной материал и тщательно втирают его круговыми движениями шпателя до тех пор, пока шпатель не перестанет свободно скользить по поверхности агара. Левой рукой при этом придерживают крышку и одновременно вращают чашку. По окончании посева шпатель вынимают из чашки и закрывают крышку. Стеклянный шпатель опускают в дезинфицирующий раствор, а металлический прокаливают в пламени горелки. Засеянную чашку поворачивают дном вверх.

Посев петлей на чашки Петри с агаром. Небольшое количество посевного материала втирают петлей в поверхность среды у края чашки, несколько раз проводя петлей из стороны в сторону. После этого у места, где закончились штрихи, агар прокалывают петлей, снимая избыток посевного материала. Зигзагообразными движениями распределяют оставшийся на петле посевной материал по всей поверхности чашки. По окончании посева закрывают чашку и прожигают петлю.

Посев на секторы. Чашку со стороны дна расчерчивают на секторы. Посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру. При этом необходимо следить, чтобы штрихи не заходили на соседний сектор. Чашку закрывают и прожигают петлю.

Посев на агаровые среды тампоном. Слегка приоткрыв крышку, вносят в чашку тампон и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, вращая при этом тампон и чашку. Чашку закрывают и поворачивают дном вверх.

Посев на агаровые среды газоном. Примерно 1 мл жидкой культуры (если культура выращена на плотной

среде, ее эмульгируют в физиологическом растворе или бульоне) наносят пипеткой на поверхность агара и тщательно распределяют жидкость на поверхности среды. Чашку слегка наклоняют и пипеткой отсасывают избыток культуры, выливая его в дезинфицирующий раствор. Туда же помещают пипетку.

Посев в толщу плотной среды. Культуру, выращенную в жидкой среде, или взвесь микробов вносят в склянку с растопленной и остуженной до температуры 45° агаровой средой, перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки поворачивают дном вверх. Для посева в толщу агара можно также внести посевной материал в пустую стерильную чашку Петри и залить 15—20 мл остуженного до 45° агара. Для перемешивания содержимого чашки ее слегка покачивают или вращают. После застывания среды чашку поворачивают дном вверх.

Посев во флаконы, колбы, матрацы и бутыли производят примерно так же, как в пробирки, только сначала набирают посевной материал, а потом открывают пробку в сосуде со средой. После посева чашки, флаконы и т. д. надписывают: пробирки в верхней части, чашки со стороны дна.

Контрольные вопросы

1. Что такое асептические условия?
2. Нужны ли асептические условия при работе с культурами микроорганизмов? Обоснуйте ответ.

Задание. Заполните форму № 8, перечислив известные Вам способы посева и применяемые при этом инструменты.

Форма № 8

Методы посева на среды				
плотные			жидкие	
в чашках Петри	в пробирках		в пробирках	во флаконах
	со скошенным агаром	с агаром столбиком		

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомить учащихся с основными методами культивирования микробов в искусственных условиях.

Для успешного культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, помимо правильно подобранных сред и правильно произведенного посева, необходимы оптимальные (наиболее благоприятные) условия: температура, влажность, аэрация (снабжение кислородом) и т. д.

Температура

Для большинства патогенных микробов оптимальная температура 37°. Исключение составляет возбудитель чумы, развивающийся при 25—30°. Отклонение температуры от оптимума неблагоприятно влияет на развитие микробов, поэтому их выращивают в особых аппаратах — термостатах, в которых с помощью автоматических устройств постоянно поддерживают нужную микроорганизмам температуру.

Термостат — это двустенный шкаф. Между стенками находится воздух или вода, подогреваемые с помощью электричества. Иногда микроорганизмы выращивают в специально оборудованной термальной комнате. Температуру в термостате и термальной комнате контролируют с помощью термометра.

Пробирки с посевами помещают в штативы или банки и устанавливают на полках термостата. Чашки должны стоять дном вверх. Чтобы воздух в термостате свободно циркулировал (и нагрев был равномерным), полки должны быть решетчатыми или иметь прорези. По той же причине нельзя очень плотно загружать термостат. Во избежание охлаждения термостата его нельзя держать долго открытым.

В обязанности лаборанта входят наблюдение за чистотой в термостате и ежедневная регистрация температуры. При неисправной работе термостата необходимо вызвать мастера.

Свет

Подавляющему большинству микробов (к ним относятся все патогенные микроорганизмы) свет не нужен. Поэтому их культивируют в темноте.

Однако пигментообразование происходит у микробов активнее на рассеянном свету. Для изучения способности к образованию пигмента культуры после инкубации в термостате оставляют на 2—3 дня при комнатном освещении. Следует избегать попадания на культуры прямых солнечных лучей, которые действуют губительно на большинство микробов.

Влажность

Жизнь микробов невозможна без влаги, так как питательные вещества проникают в клетку только в растворенном виде. Это необходимо учитывать при культивировании микробов на плотных средах. Из патогенных микробов особенно чувствителен к отсутствию влаги гонококк.

Аэрация

По потребности микробов в свободном кислороде их делят на аэробы и анаэробы. Обе эти группы требуют различных условий культивирования.

Культивирование аэробов и факультативных анаэробов

Пассивная аэрация — это культивирование микробов на плотных или жидких средах в сосудах, закрытых ватными или ватно-марлевыми пробками, или в чашках Петри. При такой аэрации микробы потребляют кислород, растворенный в среде, находящийся в сосуде над средой и поступающий через пробку. Пассивно аэрируемые культуры можно выращивать на поверхности или в тонком слое питательной среды, в которую проникает кислород.

Активная аэрация применяется при глубинном культивировании микробов, когда их выращивают в больших объемах жидкой среды. Чтобы обеспечить достаточное снабжение кислородом таких культур, их помещают в специальные качалки, в которых происходит постоянное перемешивание культуры и обеспечивается соприкосновение ее с воздухом.

При глубинном культивировании применяют также продувание воздуха через культуру. Это необходимо при

культивировании в больших объемах жидкости, достигающих десятков и сотен тысяч литров. Для такого культивирования пользуются специальными приборами, называемыми ферментерами или реакторами.

Количество подаваемого в среду кислорода зависит от вида микроба и фазы его роста.

Культивирование анаэробов

Культивирование анаэробов сложнее, чем аэробов, так как их необходимо изолировать от кислорода воздуха, т. е. нужно удалить кислород из питательной среды и окружающего ее пространства. Для этого предложены физические, химические и биологические способы.

Физические способы. а) Культивирование в анаэростате. Анаэростат — это герметически закрывающийся термостат со специальным устройством для откачивания воздуха. Культуры помещают в аппарат, герметически закрывают дверцу, с помощью вакуум-насоса откачивают из аппарата воздух и производят культивирование в течение определенного времени.

Портативный анаэростат (переносный) — это небольшой металлический цилиндр с герметически закрывающейся крышкой и краном для отсасывания воздуха. Посевы устанавливают в прибор, создают вакуум и ставят прибор в термостат.

Выращивать в анаэростатах культуры можно только на плотных средах, так как жидкие среды при создании вакуума будут выплескиваться из сосудов.

б) Культивирование в атмосфере инертного газа (например, азота) или водорода, замещающего воздух в анаэростате.

в) Выращивание в высоком столбике агара с глюкозой.

г) Механическая защита от кислорода — способ Виньяль-Вейона. Посев производят в пробирку с расплавленной и остуженной до температуры 42° агаровой средой. Содержимое пробирки насасывают в пастеровскую пипетку, заполняя ее до верха и оба конца пипетки запаивают. Пипетки помещают в пробирки с ватой на дне и переносят в термостат. После инкубации в толще агара можно наблюдать изолированные колонии. Этот метод используют для выделения чистых культур анаэробов.

д) Добавление в среду редуцирующих (окисляющих) веществ. Чаще всего пользуются средой Тароцци. В качестве редуцирующих веществ среда содержит 0,5% глюкозы и кусочки свежих органов животных или мясного фарша. Перед посевом среду кипятят 20 минут на водяной бане для удаления растворенного в ней кислорода. Посев производят на неостывшую среду (при температуре 42—45°), пока она вновь не насытилась кислородом. После посева в пробирку наливают стерильное вазелиновое масло слоем 1—1,5 см. Оно препятствует попаданию кислорода воздуха.

Химический метод. На дно эксикатора наливают щелочной раствор пирогалола или гидросульфита натрия (они жадно поглощают кислород). В эксикатор помещают пробирки или чашки с культурами, закрывают герметически крышку и ставят в термостат.

Биологический метод — совместное выращивание культур анаэробов и аэробов на одной чашке Петри. В чашку наливают толстым слоем агар и добавляют 5% крови. По диаметру чашки делают в среде желобок, чтобы культуры не смешивались. На одну половину среды засевают культуру аэроба, на другую — анаэроба. Края чашки заливают парафином. Чашки помещают в термостат. Сначала происходит рост аэробов. После того, как они поглотят кислород, находящийся в чашке, начнут расти анаэробы.

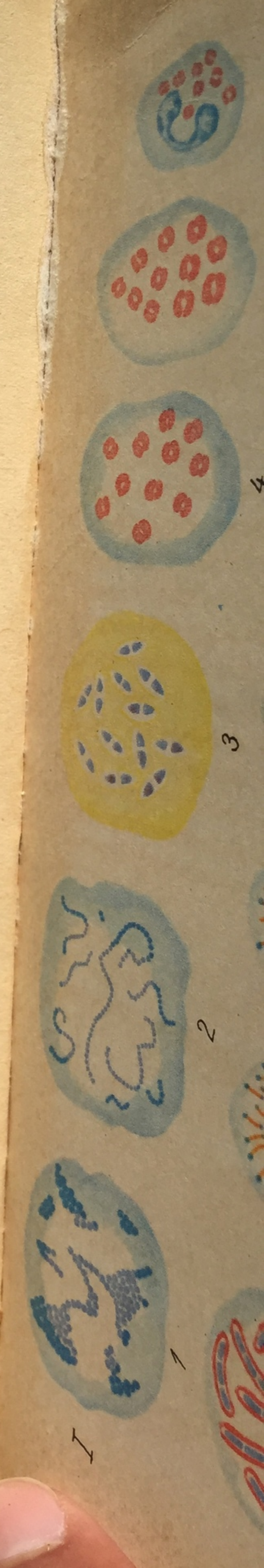
Контрольные вопросы

1. Укажите условия, необходимые для успешного культивирования микроорганизмов in vitro.
2. Укажите оптимальную температуру для выращивания патогенных микробов. В каком приборе можно создать такую температуру?
3. В чем основное отличие условий культивирования аэробов и анаэробов?
4. Как называется прибор для выращивания анаэробов? Чем он отличается от термостата?
5. Для выращивания каких микробов служит среда Тароцци?

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия: ознакомить учащихся со способами выделения чистых культур микроорганизмов и особенностями их роста на различных средах.

Чистая культура содержит микроорганизмы только одного вида.



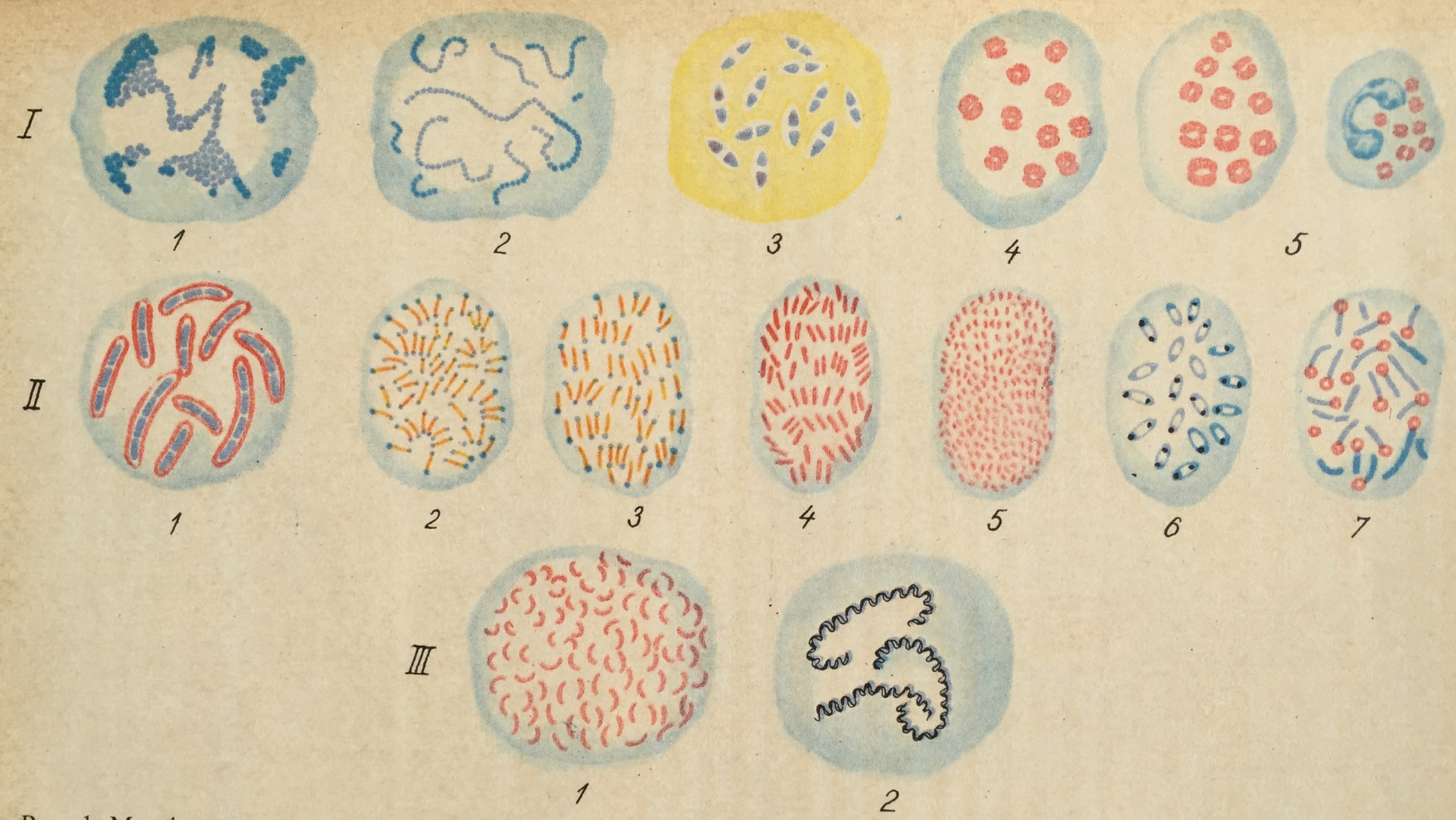


Рис. 1. Морфология микроорганизмов.

I Шаровидные бактерии: *1* — стафилококки; *2* — стрептококки; *3* — пневмококки; *4* — менингококки; *5* — гонококки в лейкоците.

II Палочковидные бактерии: *1* — стрептобациллы; *2* — возбудители дифтерии; *3* — палочки псевдодифтерии; *4* — кишечные палочки; *5* — возбудители коклюша; *6* — возбудители чумы; *7* — возбудители столбняка со спорой.

III Извитые формы бактерии: *1* — вибрион; *2* — спириллы.

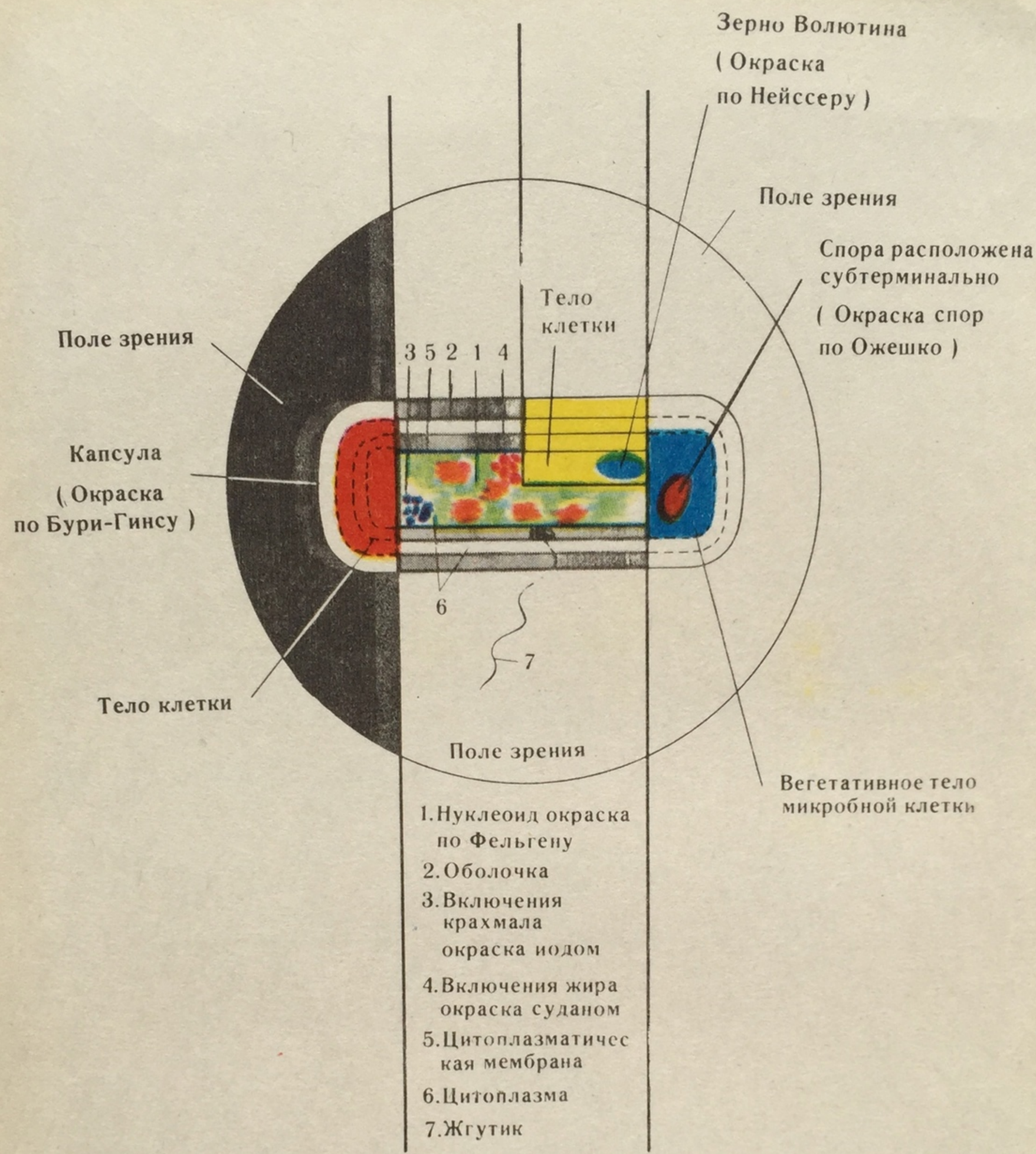


Рис. 3. Основные элементы структуры бактериальной клетки и некоторые способы их окраски.

1 — нуклеид (окраска по Фельгену); *2* — оболочка; *3* — включение крахмала (окраска (йодом); *4* — включения жира (окраска суданом); *5* — цитоплазматическая мембрана; *6* — цитоплазма; *7* — жгутики.

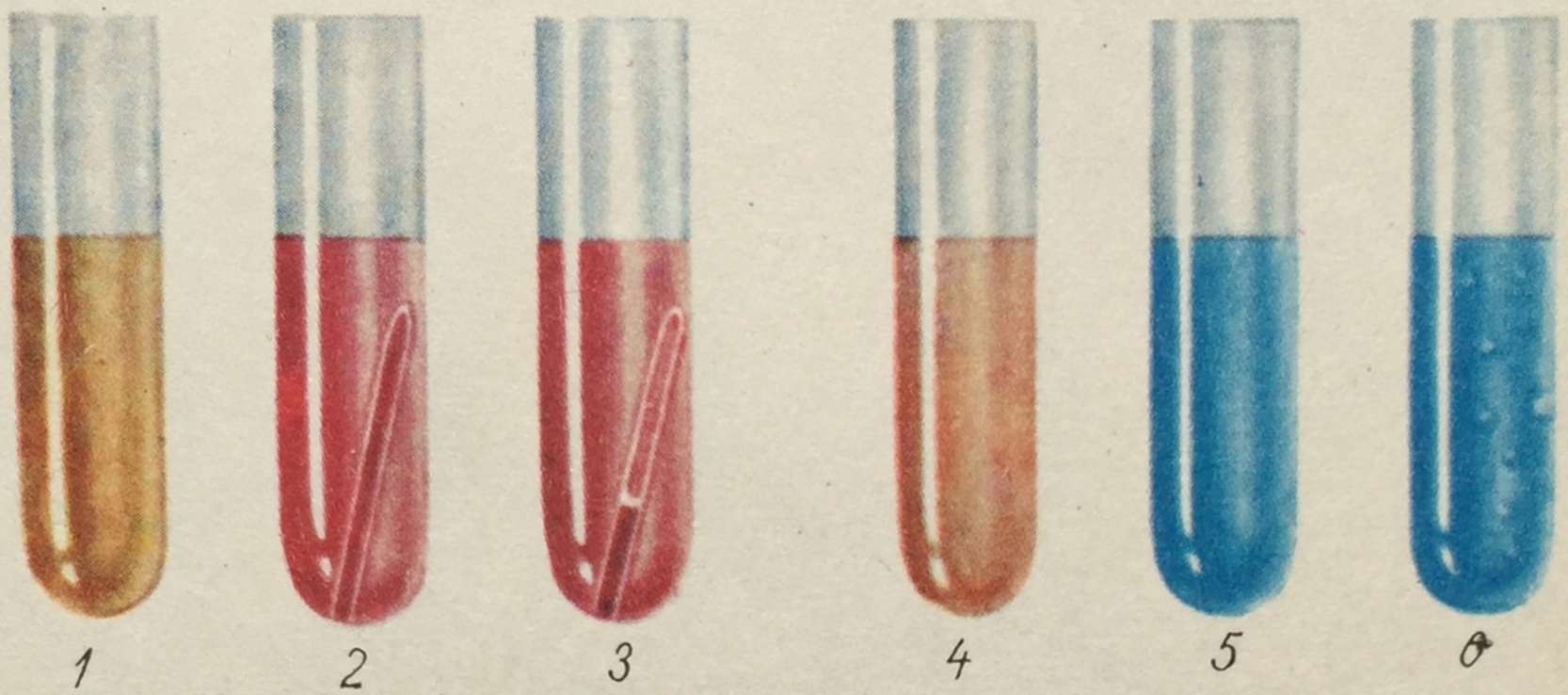


Рис. 14. Рост микробов на дифференциально-диагностических средах («пестрый ряд»).

1—3 — жидкая среда с углеводом и индикатором Андреде: *1* — микроб не ферментирует сахара; *2* — микроб ферментирует сахар с образованием кислоты; *3* — микроб ферментирует сахар с образованием кислоты и газа;
4—6 — полужидкая среда с индикатором ВР: *4* — микроб не ферментирует сахара; *5* — микроб не ферментирует сахара с образованием кислоты; *6*— микроб ферментирует сахар с образованием газа.

Рис. 15. Колонии микробов, не разлагающих лактозу (бесцветные) и разлагающих лактозу.

Вверху — фиолетовые на среде Левина; внизу — красные на среде Эндо.

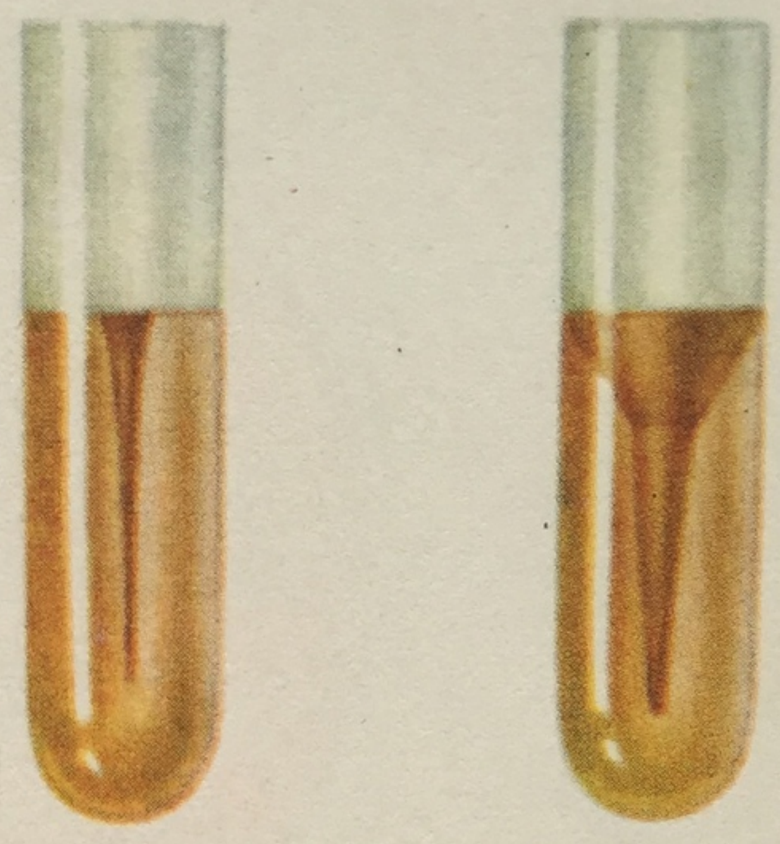


Рис. 16. Различные формы разжижения желатины.

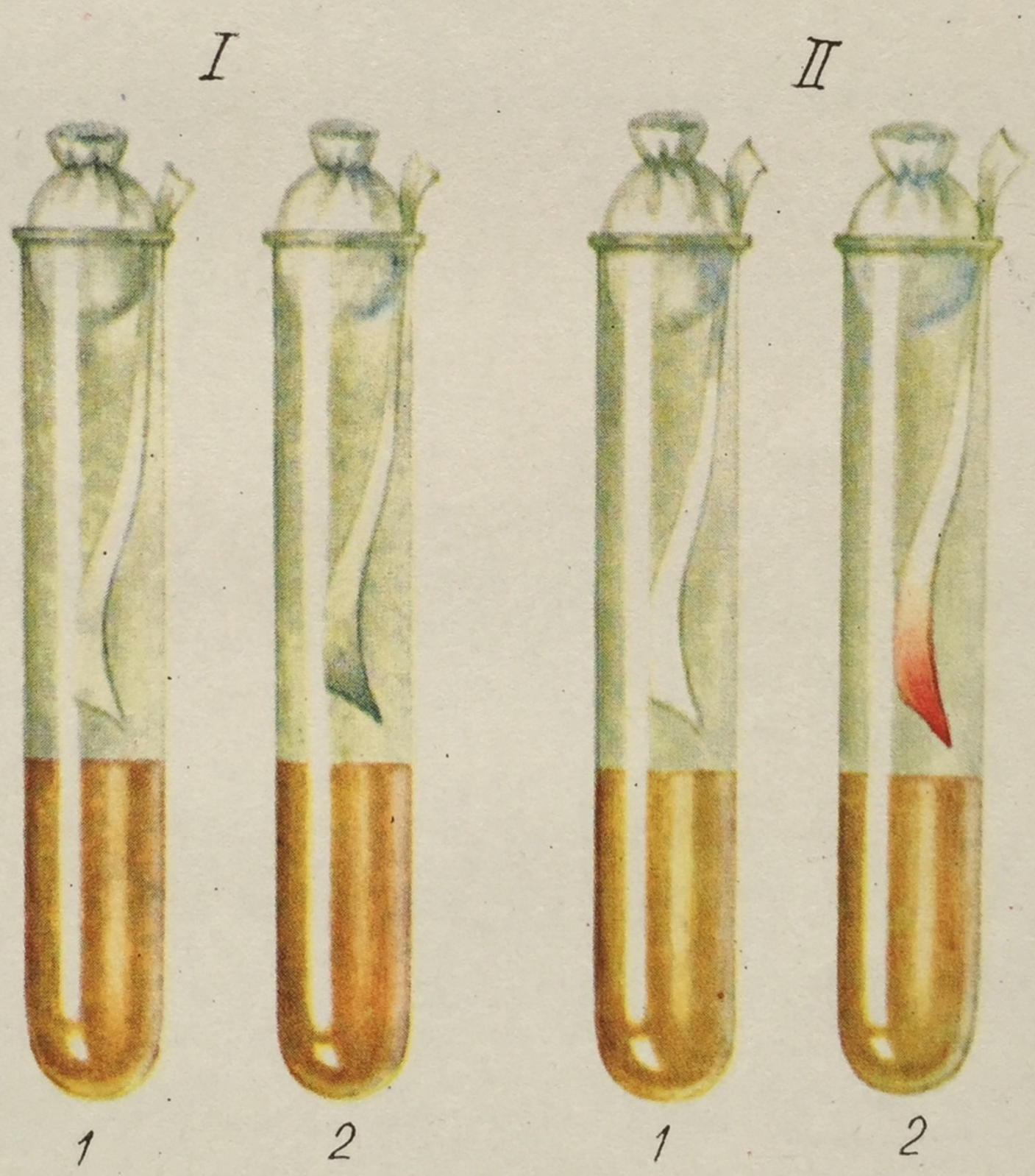


Рис. 17. Определение сероводорода (I) и индола (II) с помощью индикаторной бумажки.

1 — отрицательный результат; *2* — положительный результат.

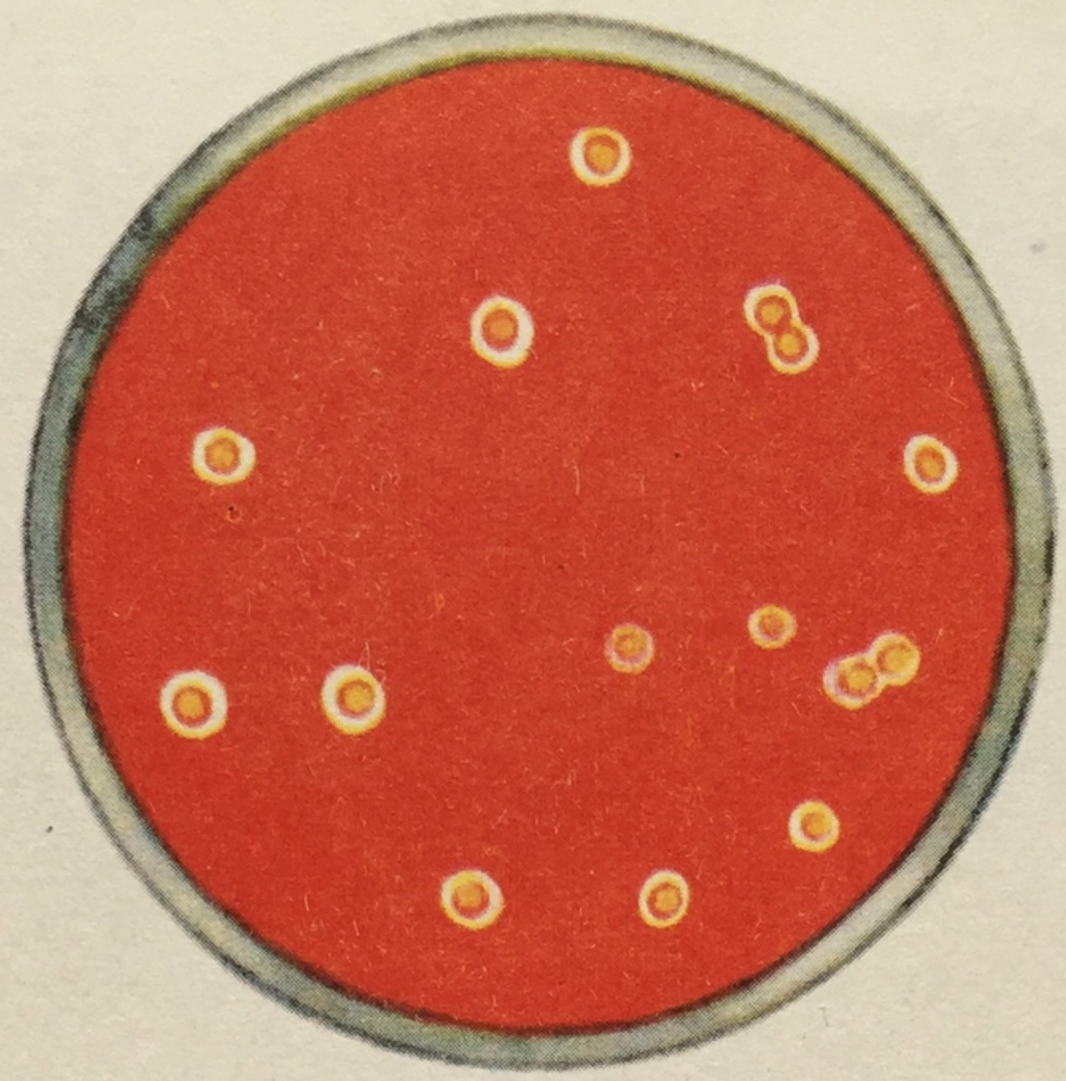


Рис. 18. Гемолиз вокруг колоний, растущих на кровяном агаре.

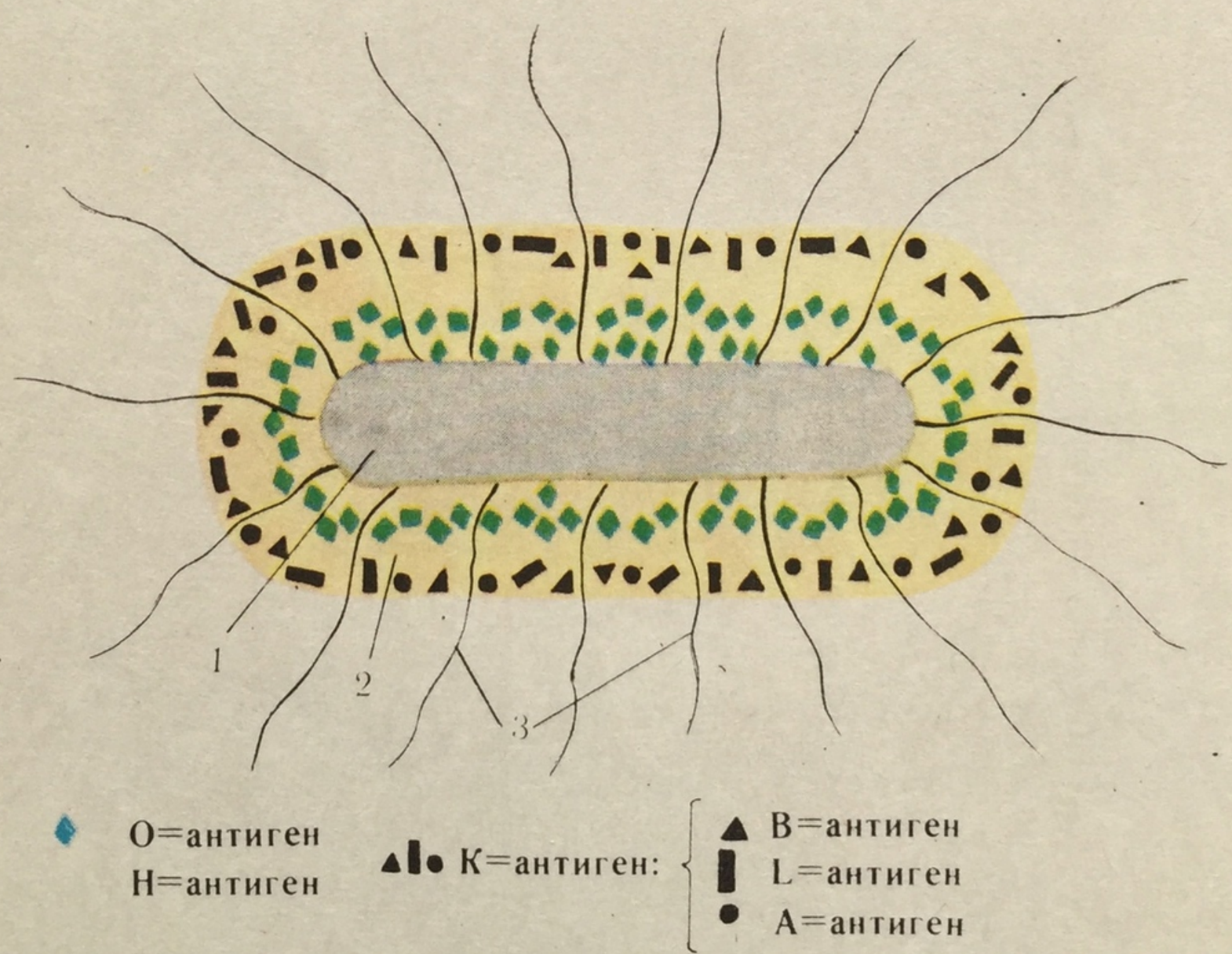


Рис. 26. Антигенная структура энтеропатогенной палочки.

1 — цитоплазма; *2* — клеточная стенка; *3* — жгутики.

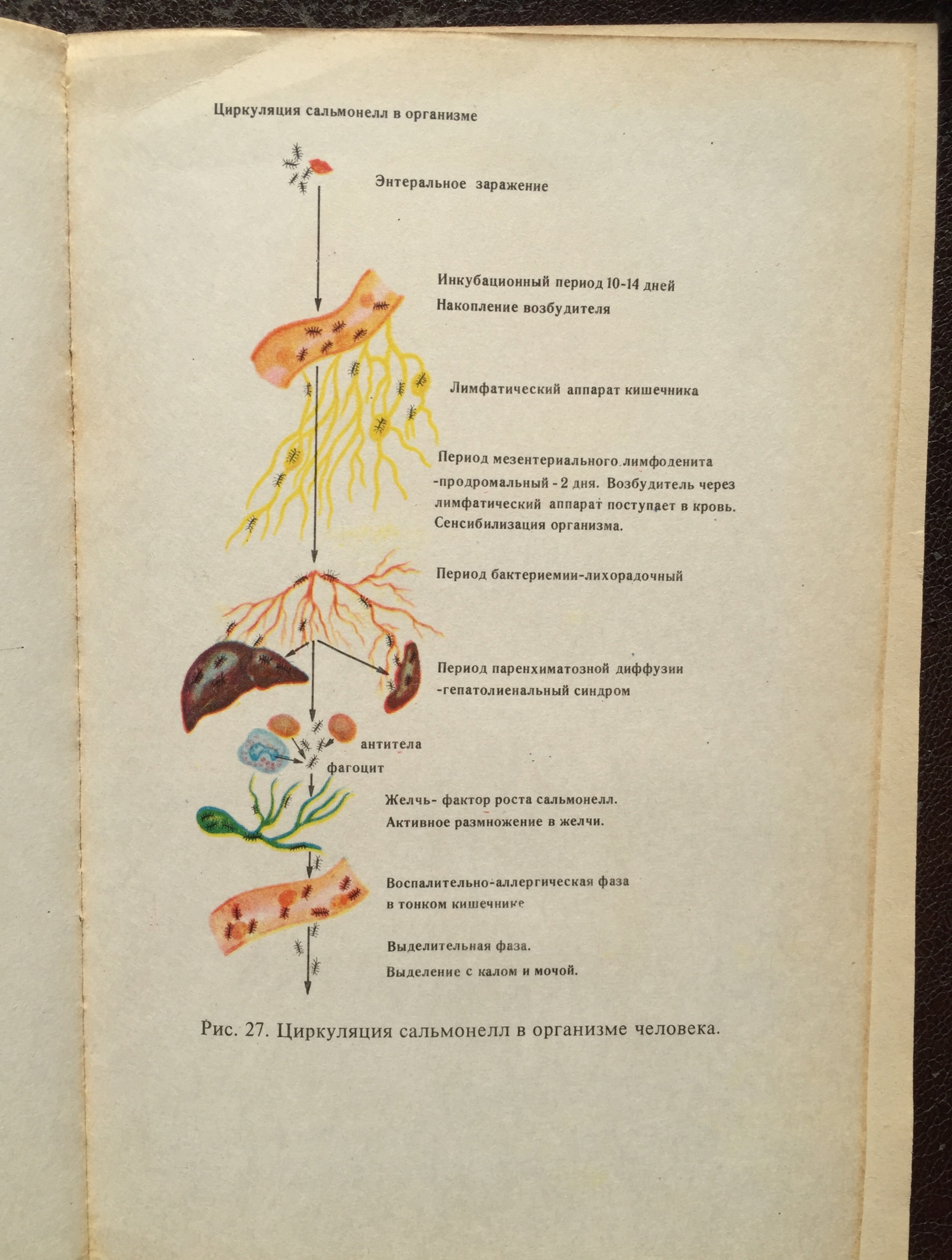


Рис. 27. Циркуляция сальмонелл в организме человека.

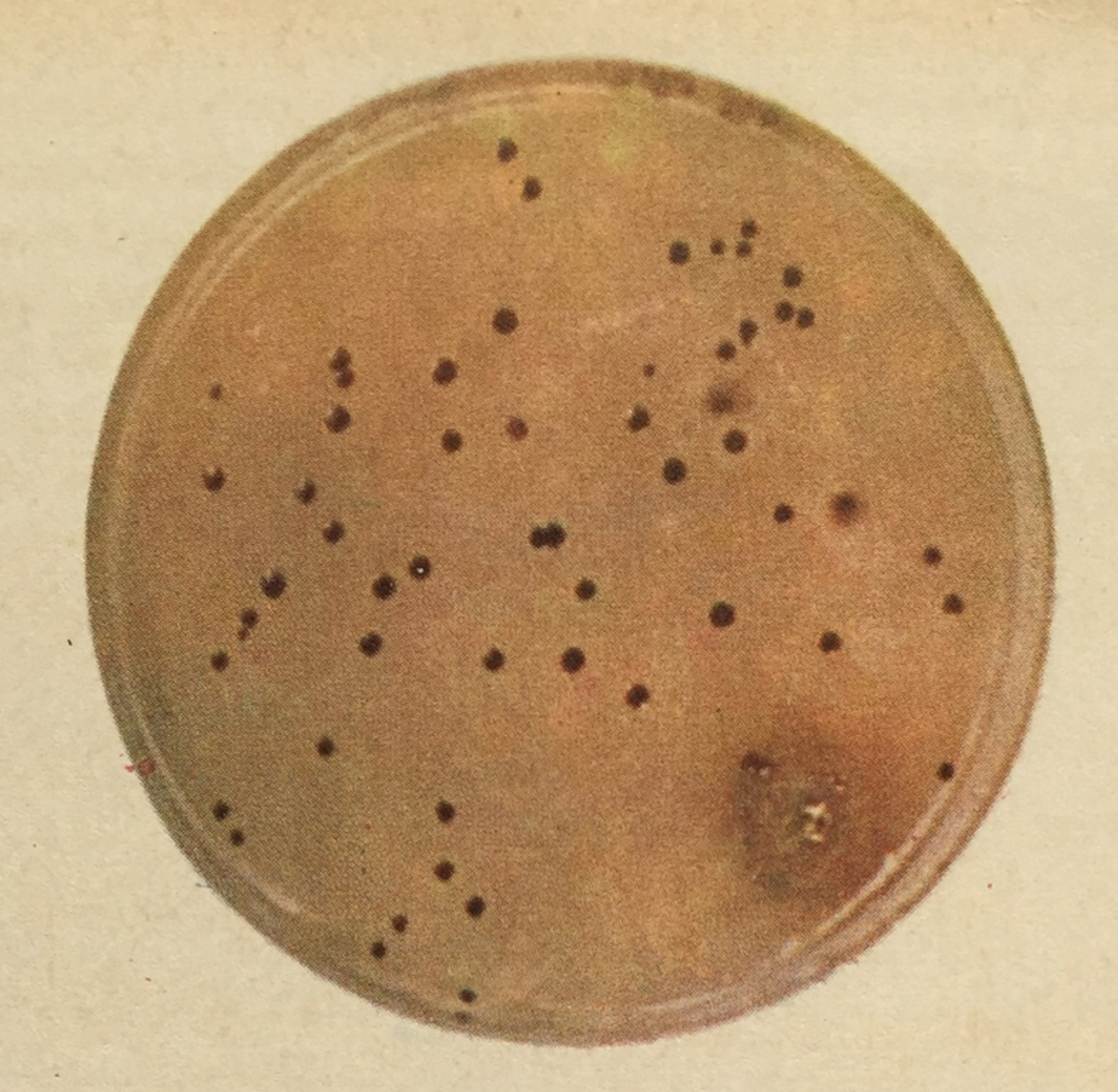


Рис. 28. Колонии сальмонелл на висмут-сульфит-агаре (черные колонии).

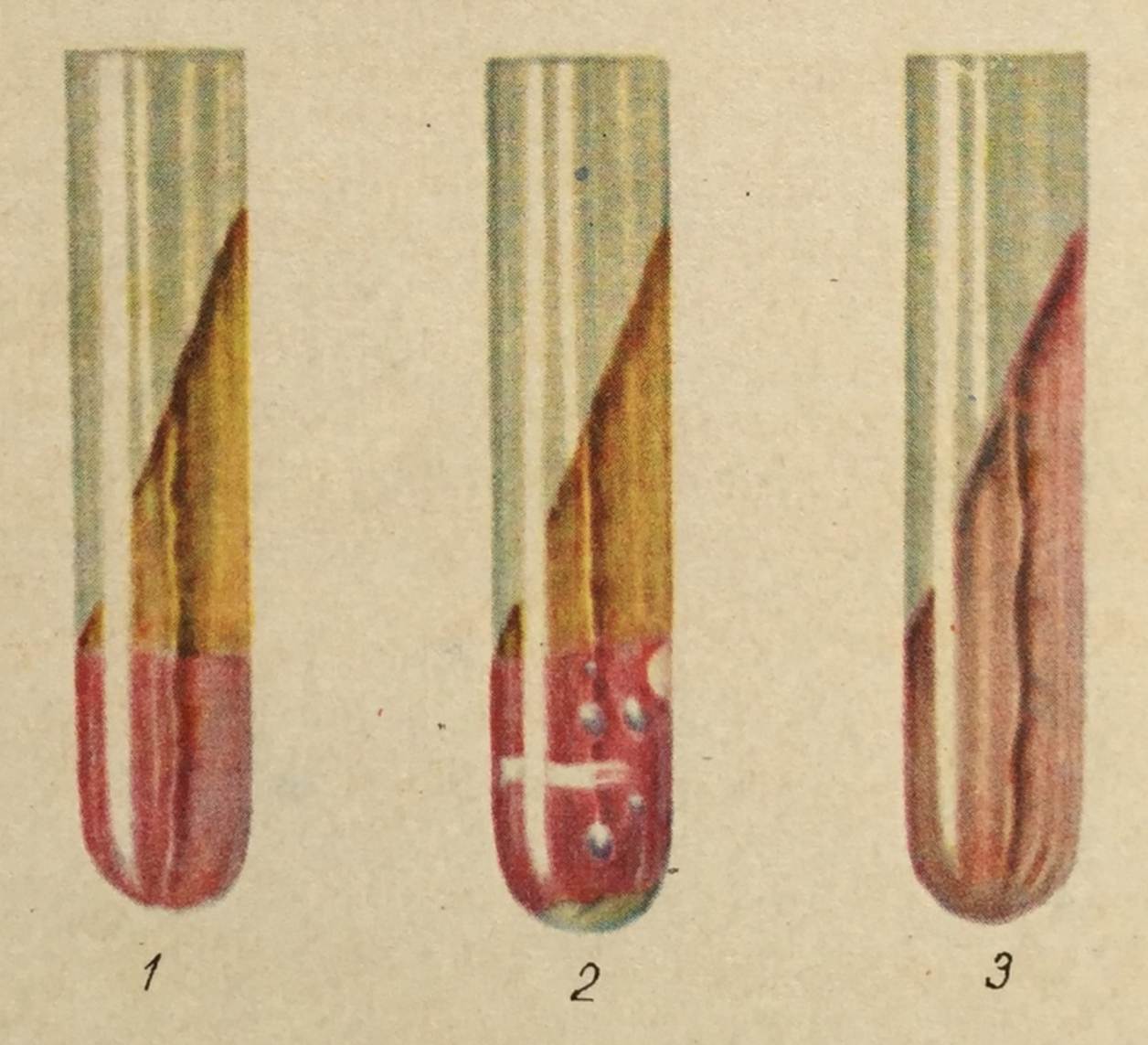


Рис. 29. Среда Ресселя с индикатором Андреде.

1 — расщепление глюкозы без образования газа; *2* — расщепление глюкозы с образованием газа; *3* — расщепление лактозы.

В окружающей среде, в организме человека и животных обычно одновременно находятся различные микроорганизмы. Поэтому для получения и изучения чистой культуры микроорганизмов ее выделяют из исследуемого материала.

Выделение чистой культуры является основой бактериологической работы. Чаще всего для выделения чистой культуры производят посев на поверхность плотной среды. Принцип метода состоит в том, чтобы получить на поверхности среды изолированные колонии.

Колония — это скопление микробов, выросших из одной микробной клетки, первоначально попавшей на среду при посеве. Колония по существу и есть чистая культура. Для изучения свойств выделенной культуры ее нужно размножить, поэтому колонию с чашки пересевают на скошенный агар.

Для получения изолированных колоний каплю материала, из которого нужно выделить чистую культуру, помещают на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. Шпателем втирают материал в поверхность среды. Этим же шпателем, не переворачивая его, производят посев на вторую и третью чашки последовательно. При этом на первую чашку пришлось много материала и соответственно много микроорганизмов, а на вторую и третью меньше. Чашки надписывают и помещают в термостат.

На 2-й день изучают рост микробов на чашках. В первой чашке обычно бывает сплошной рост и выделить изолированную колонию трудно. Во второй и третьей чашках вырастают разнообразные колонии, среди которых выбирают нужную и переносят ее на скошенный агар. Посев инкубируют в термостате. На следующий день, сделав мазок из культуры, выросшей на агаре, окрашивают его по Граму и убедившись в том, что культура состоит из микробов одного вида, приступают к изучению.

При выделении чистой культуры из крови ее предварительно «подращивают» на жидкой среде. Для этого 10—15 мл стерильно взятой крови засевают на 100—150 мл жидкой питательной среды. Так поступают потому, что в крови обычно содержится мало микробов (кровь для них среда неблагоприятная). Колбы с посевом помещают в термостат. С интервалами 2—3 дня содержимое колб засевают на агаровые пластинки для получения изолированных колоний.

4—366

При выделении чистой культуры из мочи, промывных вод желудка и других жидкостей их обычно предварительно центрифугируют в стерильных условиях и производят посев осадка. Дальнейшее выделение культуры производят обычным способом. Для выделения чистой культуры широко применяют элективные среды.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР

Цель занятия: ознакомить учащихся с основными методами изучения свойств микроорганизмов. Чтобы определить (идентифицировать), какой микроб выделен, изучают его морфологические особенности, тинкториальные свойства (т. е. отношение к краскам), подвижность, характер роста на различных средах (культуральные свойства) и особенности его ферментативной активности (биохимические свойства).

Выделение чистых культур с последующей их идентификацией имеет первостепенное значение в диагностике инфекционных болезней, при изучении объектов внешней среды и в научных исследованиях.

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

Макроскопическое (невооруженным глазом) изучение колоний микробов в проходящем и отраженном свете. В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (крупные — от 4—5 мм в диаметре и более; средние — 2—4 мм в диаметре; мелкие — 1—2 мм и карликовые — меньше 1 мм), их форму и прозрачность. В отраженном свете, рассматривая колонии со стороны крышки, определяют окраску колонии, характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), расположение колонии на поверхности среды (выпуклое, плоское, вдавленное).

Изучение роста микробов на скошенном агаре. Рост культуры может быть обильным или скудным. Поверхность ее может быть блестящей, гладкой, шероховатой или бугристой. Культура и среда могут оставаться бесцветными или окрашиваться в тот или иной цвет.

Изучение роста культур на жидких средах. Отмечают интенсивность (обильная, скудная) и характер роста (равномерная муть, осадок, пленка).

Изучение роста культур на полужидких средах. При посеве в столбик полужидкой среды можно определить подвижность микроба. Подвижные микробы при таком посеве вызывают диффузное помутнение всей толщи среды. Неподвижные микробы растут только по «уколу», оставляя остальную среду совершенно прозрачной.

Микроскопическое изучение выделенной культуры описано в главе 2.

Изучение биохимических свойств микробов. Для изучения биохимических свойств микробов пользуются дифференциально-диагностическими средами.

Сахаролитические свойства микробов, т. е. способность разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты, а иногда и газа, изучают на средах Гисса. В состав этих сред входят тот или иной углевод (сахар или многоатомный спирт) и индикатор. Под действием образующейся при разложении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Поэтому эти среды названы «пестрый ряд». Наличие газа учитывают по образованию пузырьков в толще среды, если среда с агаром, или в «поплавке», если среда жидкая. «Поплавок» — это узенькая стеклянная трубочка, запаянным концом обращенная вверх, которую помещают в пробирку с жидкой средой (рис. 14).

Кроме того, сахаролитические свойства изучают на средах Эндо, Левина, Плоскирева. Микроорганизмы, способные разлагать содержащийся в этих средах молочный сахар (лактозу) с образованием кислоты, образуют окрашенные колонии — кислота изменяет цвет находящегося в среде индикатора (рис. 15). Микроорганизмы, не разлагающие лактозу, растут в виде бесцветных колоний.

Протеолитические свойства изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При посеве уколом в столбик желатиновой среды микробы, разлагающие желатин, разжижают среду. Характер разжижения при посеве разных микроорганизмов различен (рис. 16). Микроорганизмы, разлагающие казеин (молочный белок), вызывают пептонизацию (просветление) молока, которое приобретает при этом вид молочной сыворотки. При разложении пептонов микроорганизмами могут образовываться индол, сероводород, аммиак и другие соединения.

Для обнаружения сероводорода при посеве микроорганизмов на МПБ или пептонную воду между стенкой пробирки и пробкой помещают полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца (20 г уксуснокислого свинца, 1 г двууглекислой соды, 100 мл дистиллированной воды) и высушенную. При образовании в среде сероводорода индикаторная бумага чернеет вследствие образования сернистого свинца (рис. 17—I). Для обнаружения индола используют индикаторную бумажку, пропитанную горячим насыщенным раствором щавелевой кислоты и высушенную. Ее также помещают между стенкой пробирки и пробкой. Если при росте культуры образуется индол, бумажка краснеет (рис. 17—II). Для более точного определения индола пользуются бумажками, пропитанными теплым раствором следующего состава: парадиметиламидобензальдегида 5 г, фосфорной кислоты (очищенной, концентрированной) 10 мл, 96° спирта 50 мл. Смоченная этим раствором фильтровальная бумага желтеет. Высушенную бумагу используют так же, как и бумагу с щавелевой кислотой. Под действием индола цвет бумажки изменяется до сиренево-желтого или малинового.

Гемолитические свойства микробов изучают на кровяных средах. При росте на агаре с кровью микробов, обладающих гемолитической активностью, вокруг колонии образуется прозрачная зона (там разрушены эритроциты, делающие среду мутной) (рис. 18). Если микроб при этом образует метгемоглобин, среда окрашивается в зеленый цвет.

Контрольные вопросы

1. Что входит в понятие «микробиологические методы исследования»?
2. Какой должна быть культура, подлежащая бактериологическому исследованию?
3. Что такое колония микробов?
4. Укажите основные этапы выделения чистой культуры микробов. Какой консистенции среду обычно применяют для выделения чистой культуры микробов?
5. Какой средой лучше пользоваться при выделении чистой культуры микробов, простой или элективной?
6. Почему необходимо, чтобы среды были стерильными?
7. Если изучаемый микроб не растет на простых средах, какой средой Вы воспользуетесь?
8. Что входит в понятие «культуральные свойства микробов»?

9. На каких средах изучают сахаролитические свойства микробов? Что входит в состав этих сред? Как определить, образуется ли при расщеплении сахаров газ?

10. С помощью каких сред можно определить протеолитическую активность микробов?

11. Можно ли выращивать культуры на желатиновых средах в термостате при 37°?

12. На каких средах изучают гемолитические свойства микробов?

Задание. 1. Произведите посев на чашки с агаровыми средами шпателем, петлей, тампоном.

2. Изучите и опишите характер роста различных колоний на чашке.

3. Пересейте колонию на скошенный агар. Изучите и опишите характер роста культуры на скошенном агаре. Определите чистоту культуры и вид микроорганизма в окрашенном препарате.

4. Произведите пересев чистой культуры со скошенного агара на бульон и дифференциально-диагностические среды.

5. Изучите и опишите рост культуры на бульоне и на дифференциальных средах.

6. Поместите посевы в термостат.

Глава 5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ (РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА)

Цель занятий: познакомить учащихся с применением серологических методов для диагностики инфекций и для идентификации микробов; обучить постановке реакции агглютинации, преципитации, лизиса; познакомить учащихся с принципами постановки реакции связывания комплемента.

Реакции иммунитета, т. е. реакции взаимодействия антигена и соответствующего ему антитела, в силу высокой специфичности и чувствительности нашли широкое применение при диагностике инфекционных болезней и в научных медико-биологических исследованиях.

В реакциях иммунитета, которые мы изучаем, в качестве антитела обязательно участвует сыворотка больного человека или иммунного животного, поэтому они называются серологическими (от латинского «serum» — сыворотка).

В зависимости от состояния антигена или условий среды, в которой взаимодействуют антигены и антитела, различают реакцию агглютинации, преципитации, лизиса, связывания комплемента, нейтрализации и др.

Например, если антитела взаимодействуют с клетками (микробами, эритроцитами и т. п.) в присутствии солей (физиологического раствора), то происходит склеивание клеток (антигена) и образование осадка, т. е.

агглютинация. Если в этой реакции, кроме того, участвует комплемент, происходит его адсорбция на комплексе антиген — антитело и лизис (разрушение) клеток.

Взаимодействуя с вирусами или токсинами, антитела вызывают нейтрализацию этих антигенов.

Если в реакции с антителом участвуют растворенные антигены, например экстракты клеток или тканей, гаптены и т. п., то под воздействием солей происходит реакция преципитации (выпадение осадка или образование кольца). Образовавшийся комплекс может адсорбировать на себе комплемент — происходит реакция связывания комплемента.

Серологическими реакциями пользуются в двух случаях: 1) для выявления антител в сыворотке больного, т. е. для серодиагностики инфекции, и 2) для определения вида или типа антигена, например микроба, т. е. для его идентификации.

При этом неизвестный компонент определяют по известному. Например, для обнаружения антител в сыворотке больного берут известную лабораторную культуру микроба. Если сыворотка больного реагирует с определенным антигеном, значит в ней имеются соответствующие антитела и можно думать, что данный микроб является возбудителем болезни у обследуемого больного.

Если следует узнать, какой микроб выделен, нужно его испытать в реакции с известной иммунной сывороткой. Положительный результат реакции говорит о том, что выделенный микроб идентичен тому, которым имму-

Таблица 6

Применение серологических реакций

Цель исследования	Антиген	Антитело	Положительный результат реакции
Определение антител (серодиагностика)	Известный (диагностикум)	Сыворотка больного	В сыворотке больного есть антитела к испытуемому антигену
Определение антигена (идентификация)	Неизвестный	Иммунная сыворотка	Изучаемый антиген идентичен тому, которым иммунизировали животное для получения сыворотки

низировали животное для получения данной иммунной сыворотки (табл. 6). Проведение серологических реакций требует специальной подготовки.

Посуда для серологических реакций должна быть чистой и сухой. Стерилизовать посуду не обязательно. Для серологических реакций применяют пробирки (лучше из нейтрального стекла): бактериологические размером 18×1,5 см; агглютинационные, или вассермановские,—10×1 см; преципитационные—7×0,5 см, пипетки, градуированные на 0,1; 0,2; 1; 2; 5 и 10 мл; пастеровские пипетки, колбы, предметные и покровные стекла, чашки Петри.

Инструменты и аппаратура для серологических реакций: петля бактериологическая, штативы, лупа, агглютиноскоп, термостат, холодильник, центрифуга лабораторная с набором пробирок, весы химические с разновесом, доска для гемагглютинации.

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ (РА)

Агглютинация — это склеивание и выпадение в осадок микробов или других клеток под воздействием антител в присутствии солей (физиологического раствора). Для реакции агглютинации необходимы следующие компоненты:

1. Антитело (агглютинин) находится в сыворотке больного человека или иммунного животного.
2. Антиген — взвесь живых или убитых микробов или других клеток.
3. Физиологический раствор.

При использовании реакции агглютинации для серодиагностики антителом служит сыворотка больного, а антигеном — взвесь заведомо известного микроба. Чаще всего пользуются диагностикумом, т. е. взвесью убитых микробов. Диагностикумы, как правило, готовят в производственных институтах. Серодиагностику с помощью реакции агглютинации широко применяют при брюшном тифе и паратифах (реакция Видаля), при бруцеллезе (реакция Райта и Хеддльсона), туляремии и т. д.

При идентификации микробов или других клеток антигеном служит их взвесь, а антителом — известная иммунная сыворотка. Реакция агглютинации для определения вида микроба нашла применение при диагностике кишечных инфекций, холеры, коклюша и др.

1. Сыворотки

Сыворотка больного. Сыворотку получают у больного не ранее второй недели болезни, когда можно ожидать появления в ней антител; иногда пользуются сывороткой реконвалесцентов (выздоравливающих).

Чаще всего кровь у больного берут из вены. Кровь в количестве 3—5 мл собирают в стерильную пробирку с этикеткой, на которой указаны фамилия больного, дата и предполагаемый диагноз, и направляют в лабораторию.

У грудных детей кровь берут из У-образного разреза на пятке. Кровь у больного надо брать натощак. В сыворотке крови, взятой после еды, могут содержаться капельки жира, которые делают сыворотку мутной и непригодной для исследования. Такая сыворотка называется хилезной.

Для получения сыворотки кровь оставляют на час при комнатной температуре или помещают в термостат при 37° на 30 минут. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки пастеровской пипеткой или бактериологической петлей, пробирку помещают в холодильник для лучшего отделения сыворотки, которую затем отсасывают пипеткой, снабженной резиновым баллоном или трубкой. Сыворотку можно освободить от форменных элементов центрифугированием.

Кровь у больных можно брать с помощью пастеровской пипетки или на фильтровальную бумажку из прокола мякоти пальца или мочки уха.

Взятие крови пастеровской пипеткой. Кровь насасывают в пипетку из прокола. Острый конец пипетки запаивают. Пипетку помещают в пробирку острым концом вниз. Чтобы он не сломался, на дно пробирки кладут кусочек ваты. Пробирку с соответствующей этикеткой направляют в лабораторию. Скопившуюся в широком конце пипетки сыворотку отсасывают с помощью пипетки и исследуют.

Взятие крови на фильтровальную бумагу. Кровь наносят на фильтровальную бумагу так, чтобы получить 8—10 капель диаметром около 1 см, высушивают и направляют в лабораторию. Для получения сыворотки пропитанную кровью бумагу мелко нарезают, помещают в пробирку и заливают 1 мл дистиллированной воды. Пробирку ставят на 1—2 часа в термостат или оставляют на

5—6 часов при комнатной температуре. За это время бумажка обесцвечивается. При получении сыворотки из пятен крови степень ее разведения определяют следующим образом. Пятно крови диаметром 1 см содержит примерно 0,02 мл сыворотки. Если каплю крови залить 1 мл воды, сыворотка окажется в разведении $^1/_{50}$, если 2 капли — разведение будет $^1/_{25}$ и т. д.

Иммунные диагностические сыворотки содержат антитела к тому антигену, которым произведена иммунизация. Иммунные сыворотки обычно готовят в производственных условиях. Их получают из крови животных (чаще всего кроликов или лошадей), которым предварительно многократно был введен соответствующий антиген.

В качестве антигена для иммунизации применяют взвесь живых или убитых микробов, лизаты и экстракты клеток и тканей, эритроциты и т. п.

При получении иммунных сывороток определяют их титр, т. е. то наибольшее разведение, в котором сыворотка сохраняет способность реагировать с соответствующим специфическим антигеном. Готовую сыворотку разливают в ампулы и указывают на этикетке ее название и титр. В большинстве случаев сыворотку высушивают. Сухую сыворотку перед употреблением растворяют дистиллированной водой до первоначального объема (он указан на этикетке).

2. Антигены

Взвесь живых микробов. Для приготовления взвеси испытуемого микроба пользуются чаще всего 24-часовой культурой. Микробную массу, выросшую на скошенном агаре, смывают 3—4 мл физиологического раствора. Полученная взвесь должна быть густой (содержать примерно 3 млрд. микробных тел в 1 мл) и гомогенной.

Из некоторых микробов, например стрептококков, очень трудно получить гомогенную взвесь. Приходится или отбирать специальные культуры, или подвергать взвесь соответствующей обработке. В некоторых случаях взвесь отмывают центрифугированием в физиологическом растворе 3—4 раза, а в других осадок микробов обрабатывают $^1/_{50}$ раствором NaOH, нейтрализуют $^1/_{100}$ раствором HCl, после чего готовят взвесь. Иногда пользуются бульонной культурой микробов. Если полученная взвесь нестойкая и легко выпадает в осадок, т. е. дает спонтанную агглютинацию, ее следует готовить на 0,4% растворе NaCl.

Взвесь убитых микробов. Применение взвеси убитых микробов, т. е. диагностикумов, облегчает ра-

боту и делает ее безопасной. Чаще всего используют диагностикумы, приготовленные в производственных институтах.

Постановка реакции агглютинации. Существует два основных метода проведения реакции агглютинации: реакция агглютинации на стекле и развернутая реакция агглютинации (в пробирках).

Реакция агглютинации на стекле. На обезжиренное предметное стекло наносят 2 капли сыворотки (неразведенной при работе с адсорбированными сыворотками или в разведении 1:5—1:100 при использовании неадсорбированных сывороток) и каплю физиологического раствора. В одну из капель сыворотки и в каплю физиологического раствора петлей или пастеровской пипеткой вносят культуру испытуемого микроба и тщательно ее размешивают. Нельзя при этом переносить культуру из капли с сывороткой в каплю с физиологическим раствором, которая является контролем антигена. Капля сыворотки, в которую не внесена культура, является контролем сыворотки.

Реакция агглютинации протекает при комнатной температуре в течение 1—3 минут. Если контроль сыворотки остается прозрачным, в контроле антигена (культуры) наблюдается равномерная муть, а в капле, где культура смешана с сывороткой, появляются хлопья агглютината, результат реакции считают положительным.

Развернутая реакция агглютинации. Готовят нужное количество пробирок одинакового диаметра, высоты и конфигурации дна. Готовят последовательные, чаще всего двукратные, разведения сыворотки. Метод называют объемным, если сыворотку разливают градуированными пипетками в точно отмеренных объемах.

При капельном методе сыворотку и физиологический раствор капают из пастеровской пипетки.

В реакции агглютинации сыворотку больного обычно разводят в соотношении от 1:50 до 1:1600, а иммунную сыворотку до титра или до половины титра антител (титр сыворотки указан на этикетке). Примерные схемы разведения сыворотки объемным и капельным способом приведены в табл. 7 и 8.

Объемный способ разведения сыворотки. Для приготовления исходного разведения сыворотки 1:50 смешивают 0,1 мл сыворотки с 4,9 мл физиологиче-

Таблица 7

Схема разведения сыворотки для развернутой реакции агглютинации (объемный способ)

Ингредиенты в мл	Опыт					Контроль	
	№ пробирки						
	1	2	3	4	5	сыворотки	антигена
Физиологический раствор	—	1,0	1,0	1,0	1,0	—	1,0
Сыворотка 1:50	1,0	1,0→	1,0→	1,0→	1,0		
Конечное разведение сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:50	—

Примечание. Стрелка указывает перенос сыворотки из пробирки в пробирку.

Таблица 8

Схема разведения сыворотки для развернутой реакции агглютинации (капельный способ)

Ингредиенты в каплях	Опыт					Контроль	
	№ пробирки						
	1	2	3	4	5	сыворотки	антигена
Физиологический раствор	38	12	16	18	19	19	20
Сыворотка больного или животного	2	—	—	—	—	1	—
Сыворотка из первой пробирки	—	8	4	2	1	—	—
Конечное разведение сыворотки	1:20	1:50	1:100	1:200	1:400	1:20	—

Примечание то же, что и к табл. 7.

ского раствора. Сыворотку в исходном разведении наливают в пробирки № 1 и 2 и в пробирку контроля сыворотки. Во вторую и все последующие пробирки опытного ряда и в пробирку контроля антигена наливают по 1 мл физиологического раствора. Содержимое второй пробирки тщательно перемешивают и 1 мл переносят в пробирку № 3, из пробирки № 3 в пробирку № 4 и так далее. Из последней пробирки 1 мл выливают в дезинфицирующий раствор.

Капельный способ разведения сыворотки. Пастеровской пипеткой разливают указанное в табл. 8 количество капель физиологического раствора во все пробирки опытного ряда и в две пробирки контроля. Той же пипеткой вносят 2 капли сыворотки в пробирку №1 и 1 каплю в пробирку контроля сыворотки. Затем из пробирки № 1 после тщательного перемешивания переносят 8 капель в пробирку № 2, 4 капли в пробирку № 3, 2 капли в пробирку № 4 и 1 каплю в пробирку № 5. В результате во всех пробирках оказывается по 20 капель соответствующего разведения сыворотки (примерно 1 мл).

После того как сделаны соответствующие разведения сыворотки, во все пробирки, кроме пробирки контроля сыворотки, вносят по 1—2 капли антигена — диагностикума или свежеприготовленной взвеси микробов. В пробирках при этом должна появиться небольшая равномерная муть.

Пробирки тщательно встряхивают и помещают в термостат (37°). Через 18—20 часов учитывают результат. Учет реакции агглютинации можно производить только при безукоризненных результатах в контроле: равномерной мути в контроле антигена и полной прозрачности в контроле сыворотки.

Учет реакции производят невооруженным глазом, с помощью лупы или в агглютиноскопе.

Агглютиноскоп — прибор для учета реакции агглютинации. Он представляет собой полую металлическую трубку, укрепленную на подставке. На верхней части трубки расположен окуляр с регулирующим винтом для его установки. На боковой стороне трубки имеется щель, затемненная небольшим экраном. Под трубкой расположено вращающееся зеркало. Пробирку с испытуемой жидкостью вставляют в боковое отверстие металлической трубки прибора на такое расстояние, чтобы находящаяся

на дне пробирки жидкость была под окуляром. Установив с помощью зеркала соответствующее освещение и сфокусировав окуляр, определяют наличие и характер хлопьев агглютината в изучаемой жидкости.

При положительном результате реакции в пробирках появляются хлопья склеившихся клеток, которые оседают на дно пробирки в виде «зонтика». Жидкость над осадком при этом просветляется. При встряхивании

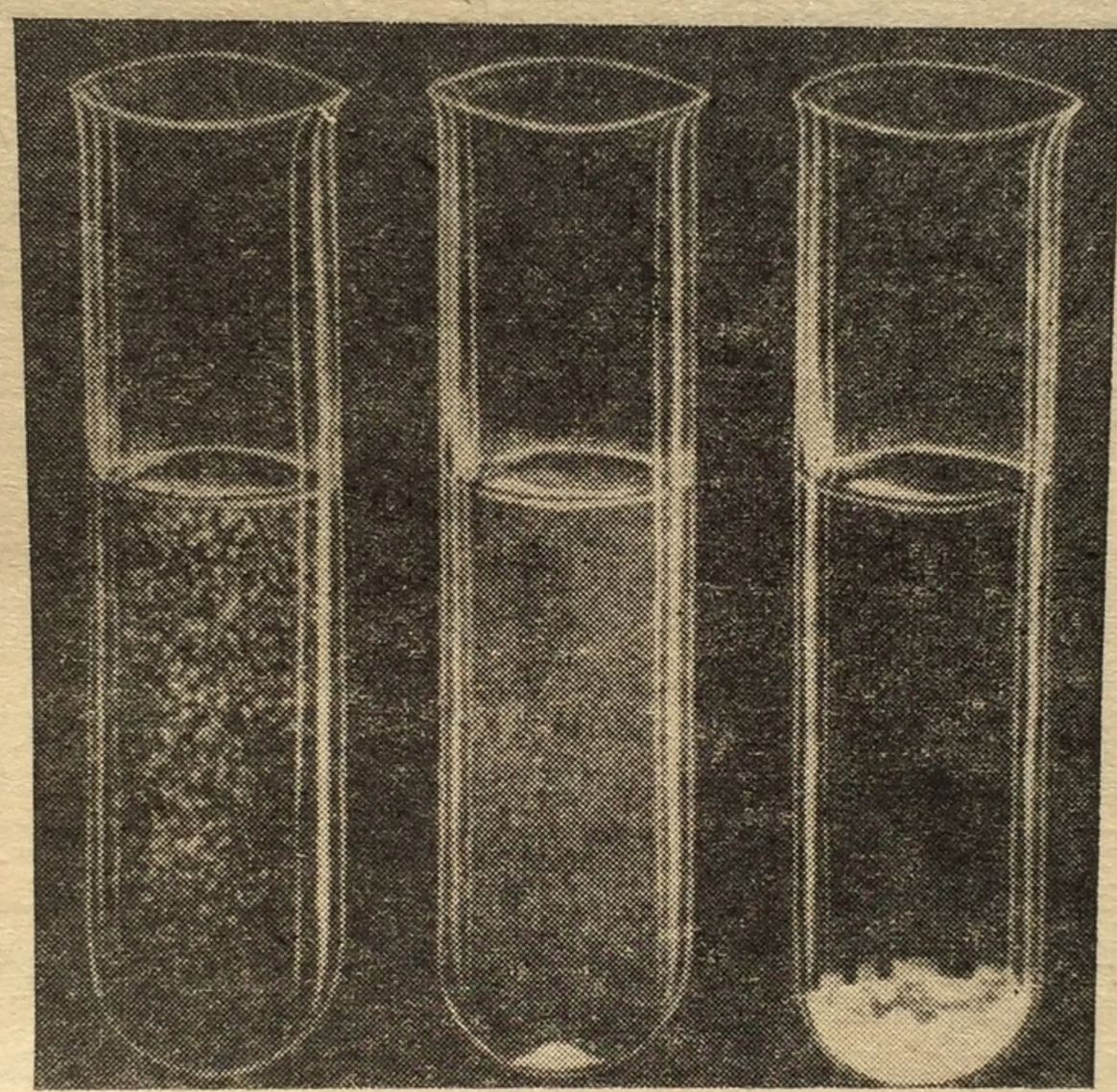


Рис. 19. Реакция агглютинации при наблюдении невооруженным глазом.

осадков (агглютината) видны хлопья, плавающие в прозрачной жидкости (сравнить с равномерно мутным контролем антигена) (рис. 19).

По характеру осадка различают мелко- и крупнозернистую (хлопьевидную) агглютинацию. Крупнозернистая (хлопьевидная) агглютинация происходит при склеивании подвижных микробов под влиянием жгутиковых (Н) антител. Мелкозернистая агглютинация получается при работе с О-сыворотками. Крупнозернистая агглютинация наступает быстрее мелкозернистой, образующийся при ней осадок очень рыхлый и легко разбивается при встряхивании.

Интенсивность реакции агглютинации выражают знаком плюс:

++++ все клетки находятся в осадке. Жидкость в пробирке совершенно прозрачна. Результат реакции резко положительный;

+++ осадок меньше, нет полного просветления жидкости. Результат реакции положительный;

++ осадок еще меньше, жидкость мутнее. Результат реакции слабоположительный;

+ на дне пробирки незначительный осадок. Жидкость мутная. Сомнительный результат реакции;

— отсутствие осадка, жидкость равномерно мутная, как в контроле антигена. Отрицательный результат реакции.

РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РГА)

Реакция гемагглютинации не является серологической реакцией иммунитета. При этой реакции склеивание эритроцитов вызвано не антителами, а особыми ферментами, которые выделяют некоторые вирусы. Например, вирус гриппа агглютинирует эритроциты кур, морских свинок, вирус полиомиелита — эритроциты барана. По наличию этой реакции можно судить о присутствии того или иного вируса в исследуемом материале.

Реакцию гемагглютинации ставят в пробирках, на специальных досках из плексигласа или на предметных стеклах. Исследуемый на наличие вируса материал разводят физиологическим раствором в соотношении от 1:10 до 1:1280; 0,5 мл каждого разведения смешивают с равным объемом 1—2% взвеси эритроцитов. Контролем служит такая же взвесь, смешанная с 0,5 мл физиологического раствора. Пробирки помещают в термостат на 30 минут, а доски или стекла оставляют при комнатной температуре на 45 минут.

При положительном результате реакции гемагглютинации на дне пробирки или в лунке доски выпадает осадок эритроцитов в виде зонтика с фестончатыми краями. При отрицательном результате эритроциты образуют на дне пробирки или лунки плотный осадок с ровными краями. Такой же осадок образуется в контроле. Интенсивность реакции отмечают плюсами. Титром вируса является его максимальное разведение, в котором происходит агглютинация эритроцитов.

Реакция торможения гемагглютинации. Эта реакция относится к серологическим реакциям иммунитета. При ней специфические противовирусные антитела, взаимодействуя с вирусом (антигеном), лишают его способности агглютинировать эритроциты.

Сыворотку разводят в соотношении от 1:10 до 1:2560. 0,25 мл сыворотки смешивают с равным объемом вирусодержащего материала в четырехкратном титре, т. е. в разведении, в 4 раза меньшем установленного титра. Смесь помещают в термостат на 30 минут, после чего добавляют по 0,5 мл 1—2% взвеси эритроцитов. В контроле сыворотки ее заменяют равным объемом физиологического раствора, а в контроле антигена физиологическим раствором заменяют материал, содержащий вирус. Учет реакции производят после повторной инкубации в термостате в течение 30 минут, а при комнатной температуре — 45 минут. Если взятая в опыт сыворотка специфична в отношении изучаемого вируса, она его нейтрализует. При этом вирус теряет способность агглютинировать эритроциты. Титром сыворотки называют ее максимальное разведение, которое вызывает задержку реакции гемагглютинации.

Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации. При этой реакции происходит агглютинация эритроцитов, на которых адсорбирован антиген, например полисахарид микроба, под влиянием специфических к нему антител. Следовательно, это реакция является реакцией иммунитета. При исследовании сыворотки больного или выздоравливающего в качестве антигена применяют взвесь эритроцитов барана, кур или человека 0-группы с адсорбированным на них соответствующим антигеном (эритроцитарный диагностикум). Испытуемую сыворотку прогревают 30 минут при температуре 56°. В пробирки или в углубления гемагглютинационных досок наливают по 0,5 мл разведений сыворотки (от 1 : 10 до 1 : 1280) и по 0,25 мл диагностикума. Пробирки помещают в термостат на 2 часа, а затем сутки выдерживают при комнатной температуре.

Контролем служит взвесь эритроцитов с заведомо иммунной и нормальной сыворотками. В первом случае должна произойти реакция агглютинации, во втором ее не должно быть. Контролем антигена служит взвесь нормальных эритроцитов, к которым добавлена испытуемая сыворотка. В данном случае агглютинации не будет. Ин-

тенсивность реакции выражают знаком плюс. Если при помощи реакции непрямой гемагглютинации определяют неизвестный антиген, то эритроциты насыщают заведомо известными антителами.

Возможные ошибки при постановке реакции агглютинации

1. Спонтанная (самопроизвольная) агглютинация. Некоторые клетки, особенно микробы в R-форме, не дают стойкой мути, а очень быстро выпадают в осадок. Во избежание ошибок следует пользоваться проверенной культурой в S-форме, не дающей спонтанной агглютинации; кроме того, каждый опыт необходимо сопровождать контролем антигена (взвесью микроба в физиологическом растворе). Только если в этом контроле будет равномерная муть, можно учитывать реакцию.

2. В сыворотках здоровых людей обнаруживают антитела к некоторым микробам (так называемые нормальные антитела). Титр этих антител невысок (не превышает 1 : 50). Поэтому положительный результат реакции агглютинации с сывороткой больного только начиная с разведения 1 : 100 говорит о ее специфичности.

3. Наличие в сыворотке больного антител к микробам, близким по строению к изучаемому (так называемая групповая реакция). Так, например, сыворотка больного брюшным тифом может агглютинировать также паратифозные микробы. Чтобы отличить специфическую реакцию от групповой, прибегают к определению конечного титра сыворотки. Специфическая реакция идет до более высоких титров, чем групповая. При постановке реакции агглютинации на стекле пользуются адсорбированными сыворотками, из которых удалены антитела к близким микробам; такие сыворотки не дают групповой реакции.

4. Следует, кроме того, учитывать, что специфические антитела после перенесенного заболевания и даже после прививок могут сохраняться длительное время. Они называются «анамнестическими». Чтобы отличить их от «инфекционных» антител, реакцию агглютинации ставят в динамике, т. е. исследуют сыворотку одного и того же больного, взятую повторно через несколько дней. Повышение титра антител говорит о наличии болезни. Титр «анамнестических» антител не повышается, а может даже снизиться.

Контрольные вопросы

1. Что такое реакция агглютинации?
2. В каких случаях применяют реакцию агглютинации?
3. Что является антигеном в реакции агглютинации при исследовании сыворотки больного?
4. Какой сывороткой пользуются для определения вида микроба и что в этой реакции является антигеном?
5. Если микроб реагирует с иммунной противохолерной сывороткой, какой это микроб?
6. При агглютинации каких микробов образуется крупнозернистый (хлопьевидный) осадок?
7. Какая разница между реакцией агглютинации и реакцией гемагглютинации?

Задание. 1. Поставьте и учтите результат развернутой реакции агглютинации с сывороткой больного.

2. Поставьте реакцию агглютинации на стекле для определения вида неизвестного микроорганизма.

РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Реакцию преципитации ставят в тех случаях, когда в качестве антигена приходится пользоваться растворенными веществами: лизатами, экстрактами, гаптенами и т. п. При взаимодействии такого антигена с антителом в присутствии солей образуется преципитат в виде мутного кольца или осадка.

Реакцию преципитации обычно применяют для определения антигена при диагностике ряда инфекций (сибирской язвы, менингита, пневмонии, дизентерии); в судебной медицине — для определения видовой принадежности крови, спермы и т. д.; в санитарно-гигиенических исследованиях — при установлении фальсификации продуктов; с ее помощью также определяют филогенетическое родство животных и растений.

Для проведения реакции преципитации необходимы следующие компоненты:

1. Антиген. В качестве антигена используют полные антигены, гаптены, экстракты или лизаты микроорганизмов, экстракты или лизаты клеток и тканей, т. е. растворенные вещества белковой или липоидно-полисахаридной природы.

2. Антитело (преципитин) — иммунная сыворотка, содержащая антитела в высоком титре (не ниже 1 : 100 000). Титр преципитирующей сыворотки устанавливают по наибольшему разведению антигена, с которым она дает реакцию. Сыворотку обычно применяют неразведенной или в разведении 1 : 5—1 : 10.

3. Физиологический раствор.

Все компоненты, участвующие в этой реакции, должны быть совершенно прозрачными.

Постановка реакции преципитации. Основные методы проведения реакции преципитации: реакция кольцепреципитации и реакция преципитации в агаре (в геле).

Реакция кольцепреципитации. Реакцию проводят в специальных пробирках диаметром 0,4—0,5 см и высотой 7—8 см.

В пробирку пастеровской пипеткой вносят 0,1—0,3 мл иммунной сыворотки. На сыворотку осторожно наслаивают антиген, наливая его тонкой пастеровской пипеткой по стенке пробирки (пробирку при этом держат в наклонном положении). При правильном наслаивании между сывороткой и антигеном должна быть четкая граница. Осторожно, чтобы не перемешать жидкости, пробирку поворачивают вертикально и ставят в штатив. При положительном результате реакции преципитации на границе антитела и антигена образуется белое кольцо — преципитат.

Реакция сопровождается рядом контролей (табл. 9).

Учет реакции производят в течение 5—30 минут, в некоторых случаях в течение часа. Как всегда его начинают

Таблица 9

Схема реакции преципитации

Ингредиенты в мл	Опыт	Контроль			
	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
Иммунная сыворотка	0,3	0,3	0,3	0,3	—
Испытуемый антиген	0,3	—	—	—	0,3
Нормальная сыворотка	—	—	—	—	0,3
Антиген, одноименный иммунной сыворотке	—	0,3	—	—	—
Чужеродный антиген	—	—	0,3	—	—
Физиологический раствор	—	—	—	0,3	—
Результат	+ или —	+	—	—	—

Условные обозначения: + наличие кольца; — отсутствие кольца.

с контроля. Реакция считается положительной при наличии кольца в первой и второй пробирках и при его отсутствии в остальных. Наличие кольца хотя бы в одной из последующих пробирок свидетельствует о неспецифичности реакции. Положительный результат реакции, т. е. наличие кольца в пробирках № 1 и № 2, говорит об идентичности изучаемого антитела с антигеном, которым иммунизировали животное для получения данной сыворотки.

Отрицательный результат (кольцо только во второй пробирке) свидетельствует о несоответствии испытуемого антигена и антител иммунной сыворотки.

Реакция преципитации в агаре (в геле). Особенность ее в том, что взаимодействие между антигеном и антителом происходит в плотной (агаровой) среде, т. е. в геле. Образующийся при этом преципитат дает в толще среды мутную полосу. Отсутствие полосы свидетельствует о несоответствии компонентов реакции.

Эту реакцию широко применяют в ряде медико-биологических исследований, в частности при изучении токсинообразования у возбудителя дифтерии (глава 16).

Контрольные вопросы

1. Что такое реакция преципитации?
2. Какие компоненты участвуют в реакции преципитации?
3. Что такое гаптен и можно ли применять его в реакции преципитации?
4. Можно ли применять мутные ингредиенты в реакции преципитации? Обоснуйте ответ.
5. Укажите основное различие между реакцией агглютинации и преципитации.
6. О чем говорит положительный результат реакции преципитации неизвестного антигена с иммунной сывороткой?
7. О чем говорит положительный результат реакции преципитации испытуемой сыворотки с известным антигеном?
8. В чем основная особенность реакции преципитации в агаре?

Задание. Поставьте реакцию кольцепреципитации для обнаружения сибиреязвенного антигена. Зарегистрируйте и зарисуйте результат.

РЕАКЦИЯ ЛИЗИСА

Антитела могут вызывать лизис, т. е. растворение клеток, только в присутствии комплемента.

Поэтому для реакции лизиса необходимы:

1. Антиген — микробы, эритроциты или другие клетки.

2. Антитело (лизин) — иммунная сыворотка, реже сыворотка больного. Сыворотка, содержащая лизины к бактериям, называется бактериолизином, к эритроцитам — гемолизином. Бывают спирохетолизины, цитолизины и т. д.

3. Комплемент — неспецифический белок, содержащийся в свежей сыворотке человека и теплокровных животных. Больше всего комплемента в сыворотке морской свинки. Эту сыворотку (лучше смесь от нескольких животных) используют в качестве источника комплемента в реакциях иммунитета. Комплемент нестоек и разрушается при нагревании, хранении, встряхивании и т. п. Поэтому для реакции используют свежую сыворотку или ее консервируют (на каждые 10 мл сыворотки добавляют 0,2 г борной кислоты и 0,3 г сернокислого натрия). Консервированным комплементом можно пользоваться в течение двух недель.

В настоящее время выпускают сухой комплемент. Перед употреблением его растворяют дистиллированной водой до первоначального объема.

4. Физиологический раствор.

Чаще всего реакцией лизиса пользуются для индентификации антигена и для реакции гемолиза, т. е. лизиса эритроцитов под влиянием гемолизинов.

Существует два метода проведения реакции лизиса: in vitro — в пробирке и in vivo — в организме животного.

Реакция лизиса в пробирке (in vitro)

Реакция гемолиза. В реакции гемолиза участвуют:

1. Антиген — взвесь эритроцитов барана.

2. Антитело — гемолитическая сыворотка, т. е. сыворотка животного, иммунизированного эритроцитами барана.

3. Комплемент — сыворотка морской свинки.

Приготовление антигена для реакции гемолиза. Кровь у барана берут из яремной вены. Ее собирают в стерильную банку со стеклянными бусами и энергично встряхивают в течение 10—15 минут (дефибринируют). Эритроциты отмывают от плазмы физиологическим раствором. Для этого дефибринированную кровь центрифугируют 10 минут при 2000—3000 оборотах в минуту. Плазму отсасывают, а к осадку эритроцитов добавляют равное объему плазмы количество физиологического раствора. Содержи-

мое пробирки тщательно перемешивают и снова центрифугируют при той же скорости не больше 10 минут. Удаляют надосадочную жидкость и еще раз отмывают эритроциты. После третьего центрифугирования жидкость над эритроцитами должна быть совершенно прозрачной. Ее отсасывают, а из осадка эритроцитов готовят 3% взвесь на физиологическом растворе.

Антитело (гемолизин) обычно готовят в производственных условиях. Для этого животным многократно вводят эритроциты барана. После того как у животных выработается достаточное количество антител к эритроцитам, у них берут кровь для получения сыворотки. Сыворотку прогревают при температуре 56° в течение 30 минут, чтобы разрушить (инактивировать) комплемент, и титруют, т. е. определяют ее активность. Титром гемолизина является то наибольшее разведение сыворотки, при котором происходит полное растворение 3% взвеси эритроцитов барана в присутствии комплемента. Для реакции гемолиза гемолитическую сыворотку берут в тройном количестве, т. е. в разведении, в 3 раза меньшем, чем ее титр. Например, при титре 1 : 1200 сыворотку разводят в 400 раз.

Комплементом в реакции гемолиза обычно является сыворотка морских свинок в разведении 1 : 10.

Реакцию гемолиза проводят по схеме, представленной в табл. 10.

Таблица 10

Схема реакции гемолиза

Ингредиенты в мл	Опыт	Контроль			
	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
Гемолитическая сыворотка в тройном титре	0,5	0,5	—	—	0,5
3% взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5	—
3% взвесь чужеродных эритроцитов	—	—	—	—	0,5
Комплемент 1:10	0,5	—	0,5	—	0,5
Физиологический раствор	—	0,5	0,5	1,0	—
Результат	+ Гемолиз	—	—	—	—
		Нет гемолиза			

Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 2 часа. При правильно поставленной реакции в первой пробирке эритроциты растворятся — произойдет гемолиз и содержимое пробирки станет прозрачным. В контрольных пробирках жидкость останется мутной, в них гемолиза не произойдет. Во второй пробирке для проявления гемолиза недостает комплемента, в третьей нет гемолизина, а в четвертой — ни того ни другого, в пятой антиген не соответствует антителу.

Реакция бактериолиза. В ней участвуют:

1. Антиген — взвесь испытуемого или известного микроба.

2. Антитело (лизин) — иммунная или испытуемая сыворотка.

3. Комплемент — сыворотка морских свинок.

Реакцию бактериолиза ставят в стерильных условиях, пользуясь стерильной посудой и стерильным физиологическим раствором. Ставят реакцию по схеме, представленной в табл. 11.

Таблица 11

Схема реакции бактериолиза (в пробирке)

Ингредиенты в мл	Опыт	Контроль		
	№ пробирки			
	1	2	3	4
Иммунная сыворотка или сыворотка больного	0,2	—	0,2	—
Взвесь испытуемого или известного микроба	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент 1:10	0,3	0,3	—	—
Физиологический раствор	1,4	1,6	1,7	1,9

Пробирки помещают в термостат на 2 часа, после чего из каждой пробирки высевают по 0,1 мл на чашки Петри со средой, благоприятной для роста изучаемого микроорганизма. При правильной постановке опыта через 24 часа в высеве из пробирок № 2, 3 и 4 должен наблюдаться обильный рост испытуемого микроорганизма. Отсутствие роста или слабый рост на чашке с посевом из первой пробирки говорит о лизисе, т. е. о том, что сыворотка специфична в отношении испытуемого микроорганизма. Иными словами, микроб идентичен тому микробу, в отношении которого получена сыворотка.

Если испытание проводят с сывороткой больного, то положительный результат будет свидетельствовать о том, что в ней имеются антитела к использованному в реакции антигену (микробу).

Контрольные вопросы

1. Что такое лизис?
2. Какие компоненты участвуют в реакции лизиса?
3. Каким должен быть антиген, участвующий в реакции лизиса?
4. Что такое комплемент и от какого животного его обычно получают?
5. Что такое реакция гемолиза?

Задание. Поставьте реакцию гемолиза. Зарегистрируйте и зарисуйте результат.

РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)

Реакция связывания комплемента относится к сложным серологическим реакциям: в ней участвуют комплемент и две системы антиген — антитело. Первая система, такая же как в ранее описанных реакциях, является специфической. Вторая система состоит из эритроцитов барана и соответствующей им гемолитической сыворотки. Она называется гемолитической системой и является индикатором образования комплекса антиген — антитело (первой системы) с комплементом.

В присутствии комплемента в гемолитической системе происходит лизис эритроцитов. Если комплемент связан специфической системой, гемолиза не будет.

Реакция связывания комплемента (РСК) в силу высокой чувствительности и специфичности нашла широкое применение при серодиагностике ряда инфекций и для идентификации антигенов. Особенно широко РСК применяется при диагностике сифилиса (реакция Вассермана) и других спирохетозов, при диагностике риккетсиозов, вирусных инфекций и т. д.

Для постановки РСК необходимы:

Специфическая система:
1. Антиген — обычно лизат или экстракт, реже взвесь микроба. В качестве антигена может быть использован и гаптен.
2. Антитело — обычно сыворотка больного, реже иммунная сыворотка.

3. Комплемент — сыворотка морских свинок жидкая или сухая.

Гемолитическая система	4. Антиген — эритроциты барана. 5. Антитело — гемолитическая сыворотка. 6. Физиологический раствор (лучше приготовленный на дважды дистиллированной воде).

Реакция связывания комплемента протекает в две фазы. В первой — специфической — взаимодействуют антиген, антитело и комплемент. Если антиген соответствует антителу, они соединяются и образуют комплекс, который связывает комплемент. Образовавшееся соединение мелкодисперсно и внешне не проявляется. О его образовании узнают с помощью индикатора, которым является гемолитическая система, участвующая во второй, индикаторной, фазе реакции. Гемолитическая система состоит из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки. Гемолитическая сыворотка, реагируя с эритроцитами, делает их чувствительными (сенсибилизирует) к действию комплемента, в присутствии которого эритроциты разрушаются (лизируются). Если лизиса нет, значит комплемент связан первой системой и, следовательно, антиген в ней соответствует антителу. Отсутствие гемолиза регистрируют как положительный результат реакции связывания комплемента. Если в испытуемой смеси антиген не соответствует антителу, иммунный комплекс не образуется и комплемент остается свободным. Свободный комплемент участвует во второй системе, вызывая гемолиз эритроцитов; результат реакции связывания комплемента отрицательный.

Ввиду сложности реакции связывания комплемента все компоненты, участвующие в ней, должны быть предварительно оттитрованы и использованы в реакции в определенных количествах и в равных объемах. Обычно каждый из них берут в объеме 0,5 мл, можно брать в объеме 0,25 и даже 0,2 мл. Соответственно весь опыт проводят в объеме 2,5 мл; 1,25 мл или 1 мл.

Подготовка ингредиентов реакции к опыту

Гемолитическая сыворотка (гемолизин) (см. стр. 85). Обычно пользуются готовой сывороткой, на этикетке которой указан ее титр. В случае надобности гемолитическую сыворотку титруют по определенной схеме (табл. 12). В примере, приведенном в табл. 12, титр гемолитической сыворотки равен 1 : 1500.

Таблица 12

Схема титрования гемолитической сыворотки

Ингредиенты в мл	Опыт					Контроль
	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Гемолизин 1:1200	0,5	—	—	—	—	—
» 1:1500	—	0,5	—	—	—	—
» 1:1800	—	—	0,5	—	—	—
» 1:2000	—	—	—	0,5	—	—
» 1:2500	—	—	—	—	0,5	—
3% взвесь эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент 1:10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
	Инкубация при 37° 1 час					
Результат	Гемолиз		Нет гемолиза			

При использовании свежей гемолитической сыворотки ее необходимо инактивировать, т. е. разрушить в ней комплемент. Для инактивации сыворотку прогревают при температуре 56° в течение 30 минут.

Эритроциты барана. Готовят 3% взвесь эритроцитов из расчета осадка, полученного при их отмывании (стр. 84).

Для приготовления гемолитической системы за 30 минут до опыта смешивают равные объемы разведенной гемолитической сыворотки и взвеси эритроцитов, приливая сыворотку к эритроцитам. Полученную смесь инкубируют 30 минут при температуре 37°.

Комплемент титруют непосредственно перед опытом. При работе с сухим комплементом его растворяют до первоначального объема, указанного на этикетке.

Титром комплемента называется то наименьшее количество комплемента, в присутствии которого гемолитическая сыворотка гемолизирует 3% взвесь эритроцитов барана при 37° в течение часа.

Титрование комплемента производят по схеме, указанной в табл. 13. В приведенном примере титр комплемента равен 0,2 мл. В опыте активность комплемента может снизиться за счет частичной неспецифической адсорбции его другими компонентами реакции. Поэтому для опыта

Таблица 13

Схема титрования комплемента

Ингредиент в мл	№ пробирки										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Комплемент 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	—
Физиологический раствор	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5
Гемолитическая система по 1 мл											
Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37° на 1 час											
Результат реакции	Нет гемолиза				Гемолиз					Нет гемолиза	

количество комплемента увеличивают по сравнению с титром на 30%. Практически берут следующую за титром дозу (в настоящем примере она равна 0,25 мл). Эта доза называется рабочей дозой комплемента. Так как все компоненты в РСК, как указано выше, должны быть взяты в равных объемах (в нашем примере в объеме 0,5 мл), необходимо к рабочей дозе комплемента добавить физиологический раствор до заданного объема (в настоящем примере по 0,25 мл в каждую пробирку опыта). Чтобы избежать неточности при раздельном добавлении комплемента и физиологического раствора в каждую пробирку готовят общее разведение комплемента на весь опыт с таким расчетом, чтобы в 0,5 мл его содержалась одна рабочая доза. Например, на 50 пробирок при рабочей дозе комплемента 0,25 мл нужно взять 12,5 мл комплемента в разведении 1 : 10 и 12,5 мл физиологического раствора.

Антиген для РСК обычно получают в готовом виде с указанием его титра.

Титром антигена называют то его наименьшее количество, которое в присутствии специфической сыворотки дает полную задержку гемолиза в условиях опыта.

Антиген иногда связывает комплемент даже в отсутствии иммунной сыворотки, т. е. обладает антикомплементарным свойством. Поэтому перед опытом необходимо

определить наибольшую дозу антигена, которая не препятствует гемолизу в отсутствии специфической сыворотки. Эта доза называется растворяющей дозой антигена. Определяют ее по схеме, приведенной в табл. 14.

Таблица 14

Схема определения растворяющей дозы антигена

Ингредиенты в мл	Опыт					Контроль
	№ пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Антиген	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	—
Рабочая доза комплемента	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Физиологический раствор	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	1,5
Гемолитическая система по 1 мл						
Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37° на 1 час						
Результат	Гемолиз					Нет гемолиза

В примере, приведенном в табл. 14, растворяющая доза антигена равна 0,4 мл. Это его наибольшая доза, которая не препятствует гемолизу эритроцитов в условиях опыта. В качестве рабочей дозы берут дозу в 2 раза меньше. В нашем примере она равна 0,2 мл.

Так же как и при расчете комплемента, к рабочей дозе антигена необходимо добавить физиологический раствор до объема 0,5 мл и произвести расчет нужных объемов для всего опыта.

Антитело. Для получения сыворотки кровь у обследуемого берут натощак. Перед этим за сутки больной не должен есть жирную и острую пищу, употреблять спиртные напитки. Перед опытом сыворотку инактивируют, т. е. прогревают в течение 30 минут при температуре 56°, чтобы разрушить имеющийся в них комплемент. Инактивировать сыворотки можно на водяной бане или в специальном инактиваторе с терморегуляцией. Последний способ исключает возможность перегреть сыворотки, т. е. вызвать их денатурацию, поэтому он предпочтительнее. Сыворотки больного обычно разводят в соотношении 1 : 5, иммунные сыворотки — от 1 : 10 до 1 : 160.

Проведение основного опыта реакции связывания комплемента

При постановке РСК крайне важна последовательность добавления компонентов. Вначале в пробирки с определенным объемом разведенной сыворотки прибавляют равные объемы антигена и комплемента в рабочей дозе. Опыт обязательно сопровождают контролями всех участвующих в нем ингредиентов: сыворотки, антигена, гемолитической системы и комплемента. Пробирки тщательно встряхивают и инкубируют в термостате при температуре 37° в течение часа или 18 часов в холодильнике при 4°. За это время при наличии специфического комплекса происходит связывание комплемента. За 30 минут

Таблица 15

Постановка основного опыта РСК

	Ингредиенты в мл	Опыт	Контроль					
		№ пробирки						
		1	2	3	4	5	6	7
			сыворотки	антигена	гемосистемы	комплемента в дозе		
						1/2	1	2
I фаза	Сыворотка 1:10	0,5	0,5	—	—	—	—	—
	Антиген, рабочая доза	0,5	—	0,5	—	—	—	—
	Комплемент, рабочая доза	0,5	0,5	0,5	—	0,25	0,5	1,0
	Физиологический раствор	—	0,5	0,5	1,5	1,25	1,0	0,5
	Инкубация при 37° 1 час или при 4° 18 часов							
II фаза	Гемолитическая система по 1 мл							
	Инкубация при 37° в течение 30—60 минут до полного лизиса в пробирках № 2, 3, 6, 7							
	Результат	+ или —	—	—	+	(+)	—	—

Условные обозначения: + нет гемолиза;
—гемолиз.

до окончания инкубации основного опыта в термостат помещают гемолитическую систему. Через 30 минут во все пробирки основного опыта наливают по 1 мл гемолитической системы. Пробирки встряхивают и ставят в термостат. Опыт учитывают при полном гемолизе в контроле сыворотки и антигена.

Схема основного опыта реакции связывания комплемента представлена в табл. 15.

Параллельно с исследованием сыворотки больного ставят такой же опыт с заведомо положительной сывороткой (т. е. с сывороткой, в которой есть антитела к данному антигену) и с заведомо отрицательной сывороткой, в которой нет специфических антител. При правильной постановке опыта в первом случае должна быть задержка гемолиза — результат РСК положительный, а во втором случае будет гемолиз — результат отрицательный.

Учет реакции связывания комплемента. Как указано в табл. 15, пробирки с опытом оставляют в термостате до полного гемолиза в пробирках № 2, 3, 6 и 7 контрольного ряда. При этом гемолиз раньше всего наступает в пробирке № 7 (в ней находится двойное количество комплемента). После того как в этой пробирке наступит гемолиз, т. е. содержимое ее станет совершенно прозрачным, нужно особенно внимательно следить за остальными контролями. Как только исчезнет муть в пробирках № 2, 3 и 6, следует немедленно вынуть штатив с пробирками из термостата. О том, что опыт не задержали в термостате дольше, чем нужно, говорит наличие легкой мути в пробирке № 5. В этой пробирке находится только половина рабочей дозы комплемента, и поэтому полного гемолиза при правильной постановке быть не должно.

Наличие гемолиза в контроле сыворотки и антигена (пробирки № 2 и 3) указывает, что дозы их были выбраны правильно и что сами по себе ни сыворотка, ни антиген комплемента не связывают.

В контроле гемолитической системы (пробирка № 4) при правильной работе этой системы не должно быть даже следов гемолиза, так как в ней отсутствует комплемент.

Убедившись в том, что все контроли прошли правильно, можно учитывать опыт. Отсутствие гемолиза в пробирке № 1 (опыт) расценивают как положительный результат реакции. Он свидетельствует о том, что в сыворотке есть антитела, специфичные в отношении данного

антигена, так как комплекс антиген — антитело связал комплемент и воспрепятствовал его участию в реакции гемолиза. Если в пробирке № 1 наступит гемолиз, результат реакции оценивается как отрицательный. В данном случае нет комплекса антиген — антитело. Комплемент остается свободным и участвует в реакции гемолиза.

Интенсивность РСК выражают в плюсах по схеме:

++++ полная задержка гемолиза. Эритроциты дают равномерную муть, или оседают на дно. В этом случае жидкость в пробирке остается бесцветной. Результат реакции оценивают как резко положительный.

+++ лизировано примерно 25% эритроцитов. Осадок на дне пробирки меньше, жидкость над осадком слегка розовая. Результат реакции также оценивают как резко положительный.

++ лизировано примерно 50% эритроцитов. На дне пробирки небольшой осадок, жидкость розовая. Результат оценивают как положительный.

+ лизировано примерно 75% эритроцитов. На дне пробирки очень незначительный осадок, жидкость над ним интенсивно окрашена. Результат реакции считают сомнительным.

± лизированы почти все клетки. Осадка нет, жидкость интенсивно окрашена и слегка мутная. Результат реакции отрицательный.

— лизированы все эритроциты. Жидкость интенсивно окрашена и совершенно прозрачна. Результат реакции отрицательный.

Контрольные вопросы

1. В чем принцип реакции связывания комплемента?
2. Какие компоненты участвуют в реакции связывания комплемента?
3. Какие системы антиген — антитело участвуют в реакции?
4. Что такое гемолитическая система?
5. В чем заключается подготовка к основному опыту РСК?
6. В какой последовательности проводят основной опыт. Сколько фаз в РСК?
7. О чем говорит отсутствие гемолиза в опыте РСК?
8. О чем говорит наличие гемолиза в опыте РСК?

Задание. 1. Проведите титрование комплемента и установите его рабочую дозу.

2. Поставьте основной опыт РСК. Учтите и зарегистрируйте результат опыта.

Глава 6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ (РАБОТА С ЖИВОТНЫМИ)

Цель занятия: познакомить учащихся с животными, используемыми для проведения экспериментов, способами их содержания и подготовкой к опыту.

Биологическими называют методы исследования, проводимые на лабораторных животных. Цель этих исследований: выделение микроорганизмов из исследуемого материала, особенно в тех случаях, когда возбудитель не может быть обнаружен методом посева, например при вирусных заболеваниях, риккетсиозах и т. д. Выделение чистой культуры из материала, загрязненного другими микроорганизмами, например из гноя, мокроты и т. д. Определение некоторых свойств выделенных микроорганизмов: вирулентности (степень болезнетворности), токсигенности (способность живых бактерий выделять ядовитые вещества во внешнюю среду) и токсичности (выделение ядовитых веществ после разрушения микробной клетки). Экспериментальное воспроизведение некоторых инфекций, таких, как сибирская язва, туберкулез, столбняк и др.

Заражение животных позволяет решить ряд вопросов, касающихся инфекции и иммунитета, изучить эффективность иммунобиологических препаратов, их реактивность и превентивные (предупредительные) свойства.

При выборе лабораторного животного необходимо учесть степень его восприимчивости к изучаемой инфекции и установить, не вызывает ли у него данный возбудитель заболевания в естественных условиях.

ВИДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для экспериментального заражения чаще всего используют белых мышей, крыс, морских свинок и кроликов. Для некоторых специальных исследований лабораторными животными служат обезьяны, кошки, собаки, лошади, мелкий и крупный рогатый скот, дикие животные (хомяки, суслики, дикие крысы, полевки), а также птицы: куры, голуби и т. д.

СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Животные, используемые для биологического эксперимента, содержатся в специальных условиях. Для этого существуют особые помещения — виварии. В виварии

лабораторных животных содержат в клетках или банках, установленных на стеллажах. Каждый вид лабораторных животных содержится отдельно. Помещение вивария должно быть теплым, светлым и сухим. Разводят животных в специальных питомниках в условиях, приближенных к естественным. Поступающих из питомника животных предварительно помещают в карантинное отделение.

Виварий должен иметь ряд специальных и подсобных отделений: карантинное, для содержания зараженных животных, для содержания здоровых животных, помещение, предназначенное для вскрытий, кухню.

В хорошо устроенном виварии должны быть два выхода для изоляции части помещения в случае возникновения спонтанной (т. е. возникающей без искусственного заражения) инфекции.

Наблюдение за общим состоянием животных производят ежедневно. Все изменения состояния животных, как, например, вялость, отсутствие аппетита, наличие инфильтратов или гибель животных, отмечают в специальном регистрационном журнале.

УХОД ЗА ЖИВОТНЫМИ И УБОРКА ПОМЕЩЕНИЯ ВИВАРИЯ

Для уборки вивария необходима специальная одежда: халат, фартук, резиновые перчатки, косынка и тапочки. При работе с животными, предназначенными для эксперимента с возбудителями особо опасных инфекций, дополнительно надевают клеенчатый фартук, резиновые сапоги, нарукавники, маску, очки.

Уборку начинают с осмотра клеток и банок — для выявления всех заболевших и погибших животных. Затем вынимают поилки и кормушки, очищают их от остатков пищи, тщательно моют, а стеклянные кипятят. После этого специальными металлическими скребками очищают клетку от мусора и устанавливают поилки и кормушки на место. Раз в неделю клетки и банки нужно промывать горячей водой, дезинфицировать или автоклавировать. После очистки клеток приступают к уборке помещения.

По окончании уборки весь собранный мусор сжигают в печи. Павших животных вскрывают и тоже сжигают под контролем ответственного за это лица (врача или лаборанта). Работники вивария тщательно дезинфицируют и моют руки.

Контрольные вопросы

1. Что означает понятие «биологический метод» и при каких исследованиях его используют?
2. Какие инфекции человека можно экспериментально воспроизвести на лабораторных животных?
3. Что означают понятия «вирулентность», «токсигенность», «токсичность»?
4. Что необходимо учитывать при выборе лабораторного животного?
5. Каких животных обычно используют для экспериментов?
6. Для какой цели существуют виварии и питомники?
7. Каким требованиям должно отвечать помещение вивария? Из каких отделений состоит виварий?
8. Как производят уборку вивария?

КОРМЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

Правильное и полноценное кормление животных имеет очень большое значение. Разработаны нормы рационального питания для каждого вида животных, которые утверждены Министерством здравоохранения СССР. В эти нормы входят зерновые смеси, корнеплоды, сено, отруби, овощи, продукты животного происхождения и т. д.

Количество и характер продуктов зависят от вида животных и цели опыта.

Плохое содержание и неправильное питание животных приводят к снижению их устойчивости к инфекции, что сказывается на результате опыта.

ОТБОР ЖИВОТНЫХ И ПОДГОТОВКА ИХ К ОПЫТУ

Каждый вид животных лучше всего получать из одного питомника. Для опыта отбирают животных определенной породы, одинакового веса, что приблизительно соответствует одному и тому же возрасту, и по возможности одного пола.

Отобранных животных рассаживают в чистые клетки или банки. На дно клетки кладут сено, опилки или вату. Мелких животных, например белых мышей, можно сажать по 5—8 штук. Переносят животных в лабораторию в случае необходимости в клетках или банках.

Перед опытом животных взвешивают. Для взвешивания удобнее пользоваться десятичными (без гирь) или тарированными весами.

Для проведения некоторых опытов животных ежедневно термометрируют. Измерение температуры производят специальным ртутным термометром, который перед употреблением дезинфицируют, насухо вытирают и смазывают вазелином. После употребления термометр вновь дезинфицируют. Термометр вставляют в просвет прямой кишки, причем глубина введения для каждого вида животных должна быть всегда одинакова, например для морской свинки 3,5 см. С этой целью на стеклянный столбик выше резервуара надевают ограничитель — колечко. Измерение температуры производят в течение 5 минут. Результаты регистрируют в специальном журнале. Нормальная температура тела для большинства лабораторных животных колеблется в пределах 37—39°.

Контрольные вопросы

1. Какие продукты входят в нормы рационального питания лабораторных животных? Какое значение имеет рациональное питание для проведения экспериментов на животных?
2. Как готовят лабораторных животных к опытам? С какой целью производят термометрию? В каких пределах колеблется нормальная температура у большинства лабораторных животных?

МАРКИРОВКА ЖИВОТНЫХ

Каждое животное, взятое в опыт, маркируют. Вид маркировки зависит от вида животного. Например, белых крыс и мышей метят красками: насыщенным спиртовым раствором фуксина, пикриновой кислоты, генцианфиолетового, перманганата калия, хризоидина и пр. Окрашивают разные части тела: голову, спину, переднюю правую лапку, заднюю левую лапку и т. д. Места окраски означают условные номера животных: например, окраска передней правой лапки означает № 3. Используя сочетание цвета и мест окраски, можно пометить несколько сот животных.

Для маркировки кроликов и морских свинок используют металлические пластинки, на которых выгравирован номер. Эти пластинки имеют расширенную центральную часть и два отходящих в стороны шипа. Перед употреблением пластинки погружают на 2—3 часа в спирт. Ухо подопытного животного протирают

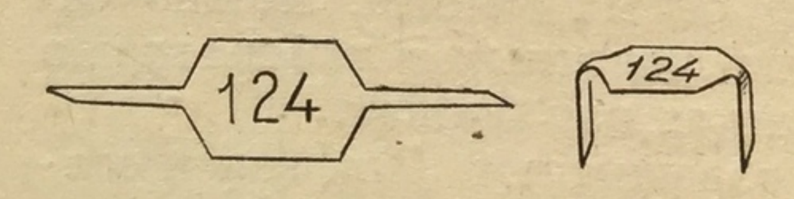


Рис. 20. Пластинка с номером для метки лабораторных животных.

спиртом, эфиром и только после этого шипы продевают в уши животного, выводят на внутреннюю поверхность уха и загибают (рис. 20). Птицам — курам и голубям — на лапку, обычно правую, надевают алюминиевое кольцо, на котором проставлен номер.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

Иммобилизация животных. Перед опытом животное нужно вынуть из клетки. Чтобы животное не укусило и не поцарапало экспериментатора, существуют различные приемы: мышей и крыс берут за конец хвоста, кроликов — за оба уха, морских свинок — за кожу спины.

Затем животное фиксируют, т. е. ограничивают его подвижность и создают наиболее удобное положение для проведения манипуляции.

Для фиксирования животных существуют разные приспособления: доски (различного типа), ящики-боксы, пластинки, станки и т. д. (рис. 21).

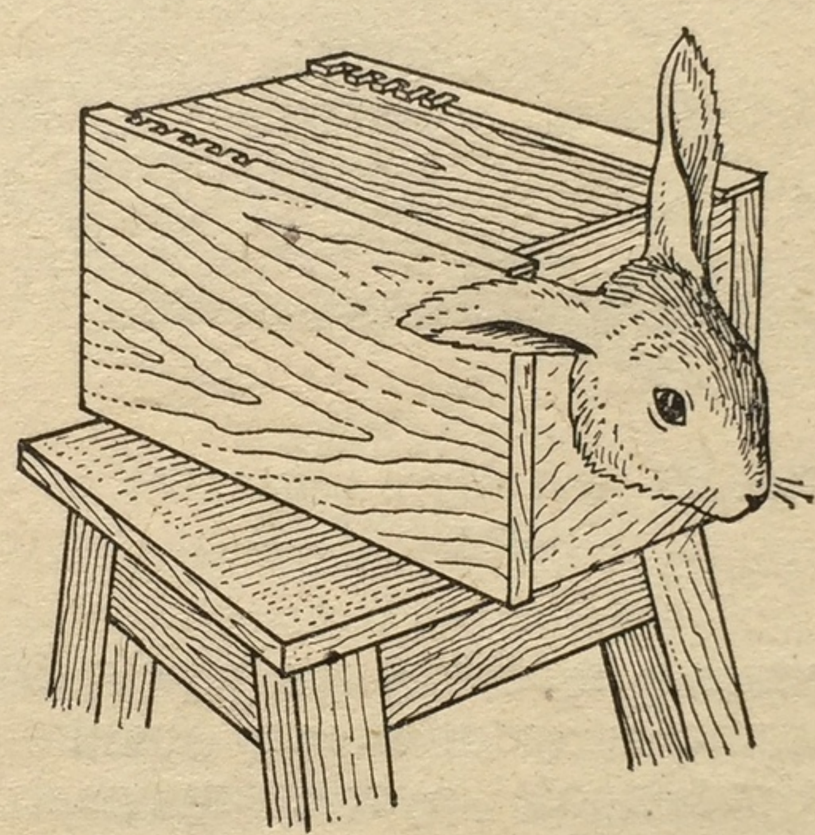


Рис. 21. Бокс для фиксации головы кролика.

Вид используемой фиксации зависит от характера манипуляции. Например, при введении материала в вену уха кролика можно использовать деревянный ящик-бокс, передняя стенка которого имеет отверстие для головы и состоит из двух половинок, одна из которых выдвигается. Животное помещают в ящик, голову просовывают в отверстие и фиксируют выдвижной половиной стенки. Чтобы фиксировать животное в лежачем положении, используют доску, которая должна соответствовать размеру тела животного. Сбоку доски, на уровне лапок, укрепляют 4 кольца или крючка. Животное кладут животом вверх или вниз в зависимости от характера манипуляции, на лапки надевают петли, сделанные из марлевого бинта или веревки, другой конец которой закрепляют на крючке или в кольце.

Применяют и более простые формы иммобилизации: животное можно плотно запеленать в полотенце или халат либо держать в положении, ограничивающем движения. Например, помощник берет морскую свинку правой рукой за задние лапки, левой — за грудь. Белую мышь можно взять за кончик хвоста, поместить на стол и, когда хвост при движении животного натягивается, левой рукой захватить кожу головы или затылка между ушами. Крыс фиксируют таким же способом, но при этом обычно применяют корнцанги.

Рис. 22. Фиксация мыши без помощника (*1*, *2*).

Работать с мелкими животными, например с мышами, можно и одному, без помощника: для этого надо захватить указательным и большим пальцами левой руки кожу затылка мыши между ушами и, повернув руку ладонью вверх, зажать левую лапку и хвост между мизинцем и мягкой частью ладони. Свободной рукой производят нужные манипуляции (рис. 22).

ПОДГОТОВКА ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Шприцы, иглы, пинцеты, скальпели, предназначенные для заражения животных, стерилизуют кипячением. Шприцы предварительно разбирают, закладывают в сетку стерилизатора. Кипятят 30 минут и затем шприц стерильно собирают при помощи пинцета.

Животное можно заражать нативным материалом: гноем, мокротой, кровью, эмульсией из органов и т. д. и взвесью микробов, густоту которой определяют с помощью оптического стандарта.

Материал, предназначенный для инъекции, помещают в стерильную посуду. Чтобы избежать разбрызгивания исследуемого материала, наполнение шприца производят

крайне осторожно. С этой целью отверстие иглы опускают ниже поверхности материала и осторожно, медленно набирают в цилиндр в количестве, несколько большем, чем требуется. Затем поворачивают шприц вертикально (иглой вверх) и, покрывая кончик иглы стерильной ватой, выталкивают из шприца пузырьки воздуха и избыток материала. Грязную вату сбрасывают пинцетом в дезинфицирующий раствор.

Контрольные вопросы

1. Как маркируют белых мышей и крыс?
2. Как маркируют кроликов и морских свинок?
3. Как маркируют птиц?
4. Для чего фиксируют животных? Какие приспособления для этого существуют?
5. Перечислите виды иммобилизации животных.
6. Как стерилизуют шприцы и режущие инструменты?
7. Как следует наполнять шприц, чтобы избежать разбрызгивания материала?

Задание. Простерилизуйте шприц. Соберите его. Наполните физиологическим раствором, накройте кончик иглы ватой и вытолкните из шприца пузырьки воздуха и избыток материала (физиологический раствор).

СПОСОБЫ ЗАРАЖЕНИЯ

Существуют следующие способы введения материала: подкожный, внутрикожный, накожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, пероральный (через рот), интраназальный (через нос в дыхательный тракт), введение в глаз, введение в центральную нервную систему и т. д.

Участок, где должна быть сделана инъекция, разрез или пункция, называют операционным полем. Чаще всего применяют подкожное введение материала. Для введения животным материала внутрикожно, подкожно или накожно необходимо освободить «операционное поле» от шерсти. Шерсть можно выстричь, с этой целью применяют ножницы с закругленными краями (чтобы избежать порезов), выщипать или удалить при помощи бритвы, растягивая для этого кожу большим и указательным пальцами левой руки (чтобы не поранить кожу).

В отдельных случаях для полного удаления шерсти применяют депиляторий [1], однако им можно пользоваться

---

[1] Состав депилятория: 7 частей талька, 7 частей белой муки, одна часть мыльного порошка и 3 части сернистонатриевого сплава.

только за 2—3 дня до опыта, так как он иногда вызывает раздражение кожи. После применения депилятория кожу очищают от шерсти, промывают теплой водой и смазывают вазелином.

При любом способе удаления шерсти перед инъекцией «операционное поле» дезинфицируют спиртом или йодной настойкой.

Подкожный способ введения — место введения выбирают в зависимости от вида животного. Кроликам материал обычно вводят под кожу спины, морским свинкам — под кожу живота или бока, мышам и крысам — под кожу спины или затылка.

Для подкожного введения кожу животного захватывают в складку, иглу вкалывают у основания образовавшейся складки, медленно вводят ее до половины, чуть отклоняя в сторону, чтобы не вылился вводимый материал, затем отпускают складку, накладывают на иглу вату, смоченную спиртом или йодной настойкой, и быстро извлекают иглу.

Внутрикожный способ введения наиболее часто применяют при аллергических пробах и введении токсина (например, дифтерийного). Для этого способа введения необходимо иметь тонкие, острые иглы (№ 18—20) с короткой бородкой. Удобно использовать туберкулиновый шприц. Кожу, освобожденную от шерсти, растягивают большим и указательным пальцами; иглу вводят под острым углом срезом вверх. Правильно введенная игла просвечивает сквозь эпидермис. Исследуемый материал вводят медленно; на месте введения образуется пузырек, который быстро рассасывается.

Накожный способ. Поверхность кожи после удаления шерсти скарифицируют [1]. Исследуемый материал наносят на скарифицированный участок и втирают шпателем или стерильной палочкой. Животное должно быть фиксировано до тех пор, пока нанесенный материал не подсохнет.

Внутримышечное введение материала производят в толщу мышцы, чаще всего в мышцу бедра. Для этого удобно захватить мышцу указательным и большим пальцами левой руки; правой под прямым углом вводят иглу.

Внутрибрюшинное введение материала. При этом способе введения животное нужно держать вертикально го-

[1] Скарификацией называют повреждение поверхности кожи, которое производят любым остроконечным инструментом: скальпелем, иглой или специальным скарификатором.

ловой вниз (для перемещения внутренних органов к диафрагме). Иглу вводят в нижнюю часть живота, чуть отступя от средней линии; такое положение уменьшает возможность ранения кишечника. Кроликам и морским свинкам предварительно делают небольшую надсечку верхнего слоя кожи. Применяют иглы с короткой бородкой (рис. 23,*1*), которые вводят под острым углом. После прокола кожи шприц переводят в горизонтальное положение и уже под прямым углом к брюшной стенке проталкивают иглу до ощущения «провала», затем ее вновь переводят в вертикальное положение и вводят исследуемый материал.

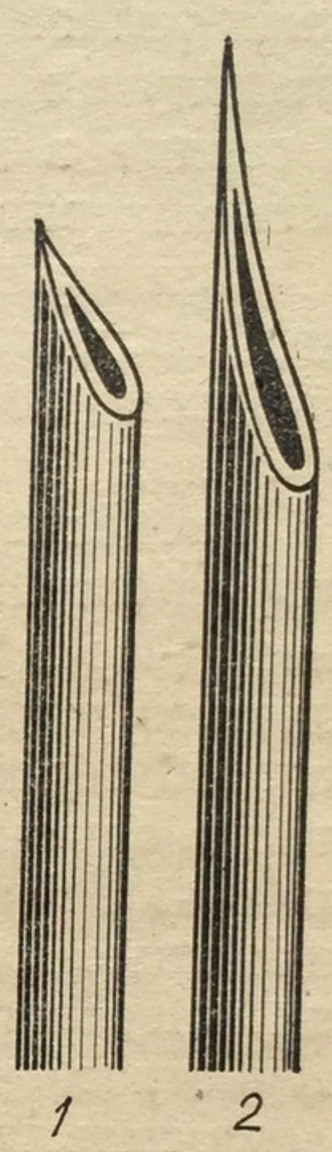


Рис. 23. Иглы для инъекций.

1—с короткой бородкой; *2* — игла с длинной бородкой.

Внутривенный способ введения. При этом методе выбор вены зависит от вида животного: кроликам материал вводят в краевую вену уха, мышам и крысам — в вену хвоста, морским свинкам — непосредственно в сердце, так как их вены малодоступны для инъекций.

Для внутривенных инъекций используют иглы с длинной бородкой (рис. 23, *2*). Животные должны быть иммобилизованы. После фиксации животного для лучшего выявления вены кожу протирают ватой, смоченной ксилолом или теплой водой. Можно также пощелкать участок кожи, где расположена вена, кончиками пальцев и прижать вену у корня хвоста или уха — эти манипуляции способствуют набуханию вены. Затем экспериментатор левой рукой фиксирует место введения, шприцем, находящимся в правой руке, прокалывает кожу и под очень острым углом, почти параллельно вене, вводит иглу срезом вверх. Если игла не попала в вену, то при надавливании поршня ощущается затруднение и в месте введения появляется белый пузырек, образованный жидкостью, попавшей в ткань. В этом случае иглу извлекают и производят новый укол ближе к корню хвоста (если используют вену хвоста) или к основанию уха (если вводят в вену уха). При попадании иглы в вену жидкость свободно проходит в сосуд. После того как материал введен, вену прижимают немного ниже места укола, накладывают кусочек стерильной ваты на кончик

иглы, находящейся еще в вене, после чего иглу извлекают. Место инъекции протирают спиртом или йодной настойкой.

Морским свинкам исследуемый материал вводят в сердце. Для этого двумя пальцами левой руки прощупывают толчок и через межреберный промежуток вкалывают иглу в место сердечного толчка. При попадании иглы в сердце в шприце показывается кровь и тогда вводят весь материал.

При инъекциях, особенно в ток крови (в вену, в сердце), вводимая жидкость должна быть свободна от пузырьков воздуха, которые могут вызвать газовую эмболию.

Введение исследуемого материала через пищеварительный тракт. Существует несколько способов перорального (через рот) заражения. Самый простой, когда исследуемый материал примешивают к пище животного. Этот способ хорош тем, что близок к естественному, однако в таких случаях трудно учесть количество вводимого материала. Второй способ — введение материала в желудок с помощью зонда, диаметр и длина которого зависят от вида животного. Вводить зонд следует после того, как в рот животного вставляют роторасширитель. Предварительно зонд смазывают вазелином. Когда введенный зонд достигает носоглотки, в рот вливают несколько капель воды и в момент глотания продвигают зонд. Правильно вставленный зонд должен продвигаться легко и свободно. После того как трубка достигла желудка, через наружный ее конец шприцем без иглы вводят нужное количество исследуемого материала. Третий способ — закапывание шприцем с иглой. Для этого животное фиксируют в вертикальном положении, открывают рот пинцетом или надавливая двумя пальцами на щеки и вводят исследуемый материал по каплям, причем каждую следующую каплю вводят только после того, как животное проглотило предыдущую. Такое медленное введение необходимо для устранения возможности попадания жидкости в дыхательные пути. Наконец, исследуемый материал можно вводить в пищевод при помощи шприца с иглой, имеющей на конце оливу. Диаметр иглы должен быть 1 мм, длина зависит от вида животного: 30—40 мм для мышей, 70—80 мм для крыс и т. д.

При таком способе введения животное фиксируют также в вертикальном положении, открывают ему рот

пинцетом и вводят иглу, ведя ее по задней стенке зева, затем переводят иглу в вертикальное положение и очень медленно вливают жидкость.

Заражение через дыхательные пути — интраназально (через нос) — проводят также двумя различными способами. Самым простым является закапывание исследуемого материала через нос шприцем (чтобы не поранить слизистую оболочку, пользуются тупой иглой). Заражение осуществляют под легким эфирным наркозом; к носу прикладывают вату, смоченную эфиром, под действием которого животное начинает глубоко дышать, втягивая при этом вводимый материал.

Второй способ — закапывание исследуемого материала в ноздри пипеткой (по каплям); при этом способе животное фиксируют в горизонтальном положении брюшком вверх.

Вводить инфекционный материал в глаз можно несколькими способами. Производят заражение через конъюнктиву. Для этого нужно придержать веко и пипеткой накапать в глаз исследуемый материал (1—2 капли). Второй способ — субконъюнктивальный. Материал вводят тонкой иглой под конъюнктиву. Этим путем можно ввести 0,1—0,2 мл. Третий способ — введение материала в скарифицированную роговую оболочку; при этом способе животное необходимо фиксировать. Глаз прижимают пинцетом, роговую оболочку скарифицируют концом скальпеля или обыкновенной иглой; в скарифицированную роговую оболочку тонким стеклянным шпателем или ватным тампоном втирают исследуемый материал. Этот способ применяют большей частью при опытах на кроликах и собаках, реже на морских свинках и других животных

Контрольные вопросы

1. С какой целью иммобилизуют животных?
2. Какие существуют приспособления для иммобилизации?
3. Отчего зависит вид используемого для иммобилизации станка?
4. Перечислите виды нативного материала, используемые для заражения лабораторных животных.
5. Что такое «операционное поле»?
6. Как обрабатывают «операционное поле» перед заражением и после инъекции?
7. Что такое депиляторий?
8. Какие способы заражения Вы знаете?

Задание. Нарисуйте схему раскраски белой мыши. Нанесите краску на схеме так, чтобы номер животного соответствовал № 3.

Таблица 16

Схема введения инфицированного материала животным

Вид животного	Средний вес животного в г	Способ введения						
		подкожный	внутрикожный	внутримышечный	внутрибрюшинный	через пищеварительный тракт	через дыхательные пути	в глаз
		(в миллилитрах)						
Кролики	3000—4000	До 30	0,1	5—8	До 20	До 5	До 4	0,2—0,4
Морские свинки	100—400	» 15	1,0	3—5	10—12	1—2	» 4	0,2—0,4
Крысы	150—200	» 10	1,0	2—3	3—5	До 2	» 3	0,1—0,2
Мыши	18—25	» 1	0,1	0,5	До 2	0,5—1,0	1,0	0,1—0,2

В табл. 16 приведены величины максимального количества вводимой жидкости в зависимости от вида животных и способа введения.

Внимание! Перед введением животному исследуемого материала познакомьтесь с табл. 16.

Контрольный вопрос

Отчего зависит количество вводимого животному материала?

ВСКРЫТИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОГИБШИХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятия: 1) познакомить учащихся с техникой и последовательностью вскрытия трупов животных; 2) научить учащихся делать посевы и мазки-отпечатки из органов трупа.

При экспериментальном заражении вскрытие животного после его гибели, характер изменений и результат бактериологического исследования внутренних органов позволяют выяснить причину смерти животного, пути распространения микробов в организме и место их локализации. В некоторых случаях животных приходится умерщвлять на определенных этапах эксперимента. Существует несколько способов умерщвления. Наиболее часто применяют следующий: животное помещают в банку или в плотно закрывающийся сосуд, в который опускают кусок ваты, смоченной эфиром или хлороформом. Гибель жи-

вотного наступает через несколько минут. Одним из способов умерщвления мелких животных, например мышей, является декапитация (мышам срезают голову). Для умерщвления кроликов используют воздушную эмболию: вводят иглу в вену, соединяют ее со шприцем без жидкости и, нажимая на поршень, вводят воздух в вену; животное погибает мгновенно.

Вскрытие следует производить непосредственно после гибели животного, чтобы избежать проникновения микроорганизмов из кишечника в кровь и другие органы. При отсутствии такой возможности трупы сохраняют на холоду.

Вскрытие производят на специальном столе, в отдельной комнате, если такая имеется.

На столе должно находиться все необходимое для вскрытия и бактериологического исследования секционного материала: доска или кювета, залитая парафином, для фиксации животного, газовая горелка или спиртовка, сосуд со спиртом и ватой на дне, в котором находятся простерилизованные инструменты (ножницы, скальпель, хирургический и анатомический пинцеты и пр.), стерильные ватные тампоны, бактериологическая петля, стерильные пастеровские пипетки, предметные стекла, чашки Петри, пробирки с питательными средами. Выбор сред зависит от вида микроорганизма, который считают причиной гибели животного.

Все наблюдения, сделанные во время вскрытия, протоколируют. Отмечают вид животного, номер, время и место заражения, материал, примененный для заражения, время гибели, обнаруженные изменения и т. д.

Во время вскрытия надо следить за тем, чтобы жидкость и кусочки тканей и органов не попали на стол. После каждой манипуляции инструменты промывают водой или спиртом и прожигают. Сделанные посевы надписывают. Мазки фиксируют над пламенем горелки или в специальной фиксирующей жидкости (например, в смеси Никифорова).

Вскрытие состоит из следующих этапов:

1) фиксация животного;
2) осмотр наружных покровов;
3) вскрытие и исследование грудной полости;
4) вскрытие и исследование брюшной полости.

Фиксация. Животных укладывают брюшком вверх. Кроликов и морских свинок привязывают за лапки к на-

ходящимся в углах доски крючкам или кольцам. Мышам и крысам лапки можно приколоть кнопками или иглами. Лапки при этом широко раздвигают.

Осмотр наружных покровов. Ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, протирают всю поверхность тела. Осматривают наружные покровы и делают разрез кожи по средней линии, начиная от лобка до нижней челюсти, стараясь не повредить при этом органы и ткани. На уровне задних и передних лапок делают боковые надрезы. Инструменты, использованные для вскрытия кожи, протирают, обжигают или меняют и только тогда продолжают вскрытие. Пинцетом захватывают край кожного лоскута и скальпелем отсепаровывают его от подкожной клетчатки. Отмечают состояние паховых и подмышечных желез, подкожной клетчатки, расширение сосудов, кровоизлияния, нагноения, отеки и т. д.

При обнаружении изменения желез — припухания, отека, нагноения — делают мазки и посев их содержимого на специальные среды.

Для вскрытия грудной полости захватывают пинцетом мечевидный отросток, под ним делают разрез, в который вставляют ножницы, и перерезают с обеих сторон ребра в месте соединения их с хрящами грудной кости. Грудину отбрасывают вверх и осматривают грудную полость. При осмотре легких и сердца отмечают их цвет, величину, консистенцию. При наличии изменений производят посев и делают мазки из измененной части легкого. Далее срезают кусочек легкого и опускают его в баночку или пробирку с водой. Здоровое легкое всплывает на поверхность, больное — тонет. Обязательно делают посев крови из сердца. Для этого придерживают сердце пинцетом у его основания, прижигают раскаленным скальпелем верхушку сердца и стерильной пастеровской пипеткой прокалывают прожженный участок, кровь при этом поднимается в капилляр. Набранную кровь выдувают по каплям в питательные среды и делают из нее мазки.

Вскрытие брюшной полости. Пинцетом приподнимают кожу брюшной стенки, ножницами делают разрез от лобка до диафрагмы, затем делают два боковых надреза — у лобка и диафрагмы, широко открывая этим брюшную полость. Осматривают все органы брюшной полости, из измененных органов делают посев на пи-

тательные среды, мазки и мазки-отпечатки. При отсутствии внешних изменений обязательно производят посев и делают мазки из селезенки, печени и мезентериальных желез. Для посева прижженную поверхность органа надрезают стерильным скальпелем, из глубины органа вырезают маленький кусочек, часть его опускают в питательную среду, из другой части делают мазки-отпечатки, прикладывая срезанную часть к стеклу, и мазки. Отпечатки всех органов можно сделать на одном стекле, соблюдая определенную последовательность в их располо-

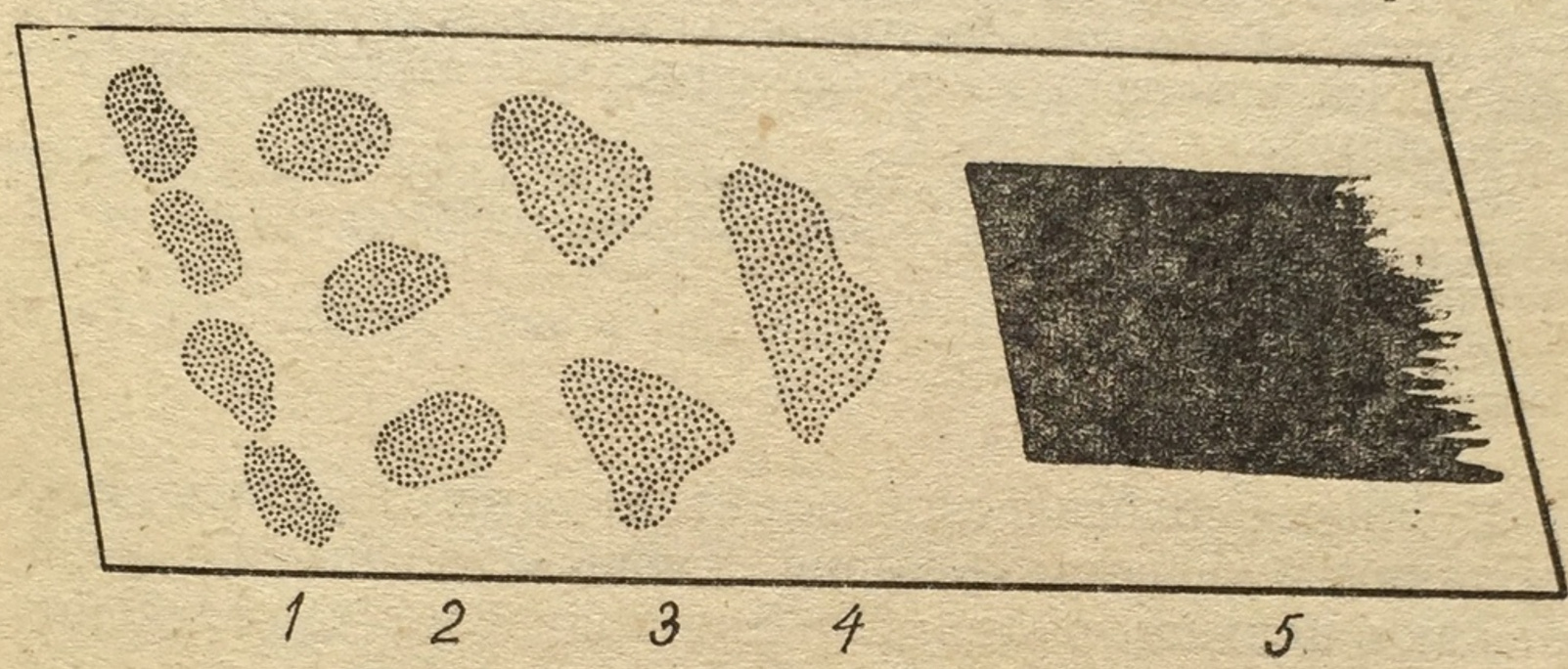


Рис. 24. Отпечатки органов.
1 — лимфатические железы; *2* — легкое; *3* — селезенка; *4* — печень; *5* — мазок из крови сердца.

жении. Этот метод принят при экспериментах на животных, зараженных возбудителями особо опасных инфекций. Зная последовательность расположения отпечатков различных органов, можно не надписывать каждый отпечаток (рис. 24).

После окончания вскрытия производят тщательную уборку рабочего места. Труп животного укладывают в банку или специальный сосуд (например, ведро) и под контролем ответственного лица сжигают или автоклавируют. Если нельзя уничтожить труп сразу после вскрытия, его заливают дезинфицирующим раствором (5% карболовой кислотой или 5% лизолом). Доску или кювету протирают спиртом и прожигают или заливают на сутки дезинфицирующим раствором. Инструменты осторожно с помощью чистого пинцета укладывают в стерилизатор и кипятят 30—40 минут. После работы с патогенными спорообразующими бактериями инструменты автоклавируют. Посевы помещают в термостат.

Зафиксированные мазки окрашивают и изучают.

Контрольные вопросы

1. С какой целью проводится вскрытие лабораторных животных?
2. Какие Вы знаете способы умерщвления лабораторных животных?
3. Перечислите оборудование и инструменты, используемые при вскрытии лабораторных животных.
4. Каким способом фиксируют животных перед вскрытием?
5. Из каких этапов состоит вскрытие лабораторных животных?
6. Как производят осмотр наружных покровов животного, что при этом надо отметить в протоколе вскрытия?
7. В какой последовательности производят вскрытие животного? Какие патологические изменения при этом можно обнаружить?
8. Расскажите о последовательности вскрытия грудной и брюшной полостей животного. Какие патологические изменения при этом можно обнаружить в органах?
9. Как готовят мазки и мазки-отпечатки из органов и тканей? Какие правила надо соблюдать при приготовлении отпечатков на одном предметном стекле?
10. Как дезинфицируют оборудование и инструменты в ходе и по окончании вскрытия?

В микробиологической практике животных используют также в качестве доноров. Кровь животных применяют как в цельном виде, так и для получения ее отдельных составных частей (сыворотка, плазма, эритроциты и т. д.). Кровь и сыворотка крови могут быть использованы как ингредиенты сред, а также для изучения иммунных свойств после вакцинации.

Чаще всего используют кровь кроликов, морских свинок, реже крыс и мышей, из крупных животных — кровь лошадей, баранов, быков.

Способ получения крови зависит от вида животного и цели исследования.

ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ КРОВИ У ЖИВОТНЫХ

У кролика небольшое количество крови берут обычно из краевой вены уха, у крыс и мышей — из вены хвоста, у морских свинок ввиду плохо развитых поверхностных вен кровь берут непосредственно из сердца. Кровь из сердца можно брать и у других лабораторных животных.

В случаях, когда донорами являются крупные животные (лошади, бараны), кровь берут из яремной вены.

Для взятия небольшого количества крови у кролика выщипывают шерсть с наружной поверхности уха, дезинфицируют кожу и вызывают гиперемию, пощелкивая по

вене пальцами или протирая ухо ватой, смоченной теплой водой (применять ксилол не следует, так как он может вызвать лизис — растворение эритроцитов).

Кроме того, можно прижать вену у корня уха, что также способствует гиперемии. Затем экспериментатор большим и указательным пальцами захватывает кончик уха (фиксируя его этим) и вводит иглу без шприца по ходу вены. Капающую из иглы кровь собирают в стерильную пробирку, после чего иглу извлекают, место укола дезинфицируют спиртом или йодной настойкой.

При взятии крови из вены хвоста у мышей и крыс используют ампутацию кончика хвоста. Вытекающую из культи кровь собирают в стерильную пробирку или насасывают пипеткой. Для остановки кровотечения культю прижигают перекисью водорода или в пламени горелки.

При взятии крови из сердца животное фиксируют в горизонтальном положении брюшком вверх, удаляют шерсть, дезинфицируют место укола, затем кончиками пальцев левой руки прощупывают сердечный толчок и в это место вводят иглу. Если игла попала в сердце, кровь сама поступает в шприц, подымая поршень. Количество взятой крови зависит от вида животного и его веса (табл. 17).

После одномоментного кровопускания животному следует ввести под кожу физиологический раствор (подогретый до температуры тела) в объеме, равном объему взятой крови.

При необходимости получить максимальное количество крови производят тотальное кровопускание (полное обескровливание). При тотальном кровопускании кровь чаще всего берут из сонной артерии. Животное фиксируют в горизонтальном положении животом вверх, наркотизируют, поднося к носу смоченную эфиром вату, и после обработки операционного поля делают разрез кожи на шее. Обнажают сонную артерию, отсепаровывают ее, накладывают две шелковые лигатуры и перерезают между ними артерию. Периферический конец артерии быстро пережимают, а центральный — захватывают пинцетом и опускают в стерильный сосуд. Когда струя крови иссякнет, можно дополнительно собрать кровь, массируя область сердца, печень и другие органы. Недостатком тотального кровопускания является гибель животного.

Таблица 17

Максимальное количество крови, получаемой от лабораторных животных

Вид животного	Средний вес донора в г	Количество крови, в мл, получаемой при	
		одномоментном взятии	тотальном кровопускании
Кролик	3000—4000	25—30	130—150
Морская свинка	400—500	10—12	40—50
Крыса	150—200	3—5	6—8

ОБРАБОТКА И ВЫДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ КРОВИ

1. **Получение дефибринированной крови.** Кровь помещают в стерильную колбу или баночку со стеклянными бусами и энергично встряхивают в течение 15—20 минут; при этом фибрин оседает на бусах в виде сгустка. Свободную от фибрина кровь переливают в стерильную посуду.

2. **Получение цитратной крови.** К крови добавляют вещество, предотвращающее ее свертывание, — 5% раствор лимоннокислого натрия в соотношении 1 : 10 (на 10 мл крови 1 мл 5% раствора лимоннокислого натрия).

3. **Получение плазмы.** Жидкую часть крови получают из цитратной крови, которую центрифугируют или ставят в холодильник на 18—20 часов. В результате над осадком образуется слой жидкости желтоватого цвета — плазма.

4. **Получение сыворотки крови** (см. стр. 72).

5. **Получение взвеси эритроцитов.** Красные кровяные шарики получают из цельной и дефибринированной крови.

Кровь центрифугируют в течение 15—20 минут при 2000—3000 оборотов в минуту. Эритроциты оседают на дно, образовавшуюся над ними желтовато-красную жидкость отсасывают, а в пробирки добавляют стерильный физиологический раствор до первоначального объема и вновь центрифугируют. Такое промывание эритроцитов производят 3—4 раза до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет совершенно прозрачной. Последнюю надосадочную жидкость удаляют, а в пробирке остается взвесь эритроцитов.

Контрольные вопросы

1. Какие животные чаще всего служат донорами крови?

2. Какова техника взятия крови у кроликов, морских свинок, крыс, мышей?

3. Что такое тотальное кровопускание?

4. Как производят забор крови из кровеносных сосудов и сердца при тотальном кровопускании?

5. Какие максимальные количества крови можно получить от лабораторных животных при одномоментном и тотальном кровопускании?

6. Как получить цитратную и дефибринированную кровь и составные части крови: плазму, сыворотку, взвесь эритроцитов?

Задание. Возьмите пробирку с кровью и получите из нее сыворотку.

Опыты на животных проводят также для определения различных свойств микроорганизмов: вирулентности, токсигенности, токсичности и т. п.

При определении вирулентности, токсигенности и токсичности микробов пользуются условными обозначениями: DLm, DCL, DL_{50}.

DLm (Dosis letalis minima) — наименьшая доза микробов или токсина, которая убивает большинство подопытных животных. DCL (Dosis certe letalis) — наименьшая доза микробов или токсина, которая убивает всех животных, взятых в опыт.

DL_{50} (Dosis letalis) — доза микробов или токсина, которая приводит к гибели только 50% подопытных животных. Эта доза вычисляется обычно статистическим путем.

Дозы, определяющие вирулентность, токсигенность и токсичность, неодинаковы для различных видов микроорганизмов. Они варьируют также в зависимости от используемого штамма микроба, вида и возраста подопытного животного, а также от способа заражения.

Для получения сравнимых результатов при определении этих доз исследование проводят на животных одного вида, одного веса и используют 18—24-часовую культуру, так как в более старых культурах много погибших клеток.

Для определения вирулентности, токсигенности и токсичности культуру выращивают на плотной питательной среде.

Бульонной культурой для определения DLm пользуются редко, так как ее трудно стандартизовать; кроме того, бульон содержит много посторонних белковых примесей.

В пробирку с выросшей на скошенном агаре культурой наливают 5—6 мл физиологического раствора и вра-

щением пробирки между ладонями или встряхиванием производят смыв. Затем определяют густоту полученной взвеси. Для этого полученную взвесь переносят пипеткой в стерильную пробирку, толщина стенки и диаметр которой должны соответствовать таковым пробирки оптического стандарта.

Существуют следующие стандарты мутности:

0,5 млрд.	микробов	в 1 мл	— № 5	(5 единиц	мутности)
0,9 »	»	» 1 »	— № 9	(9 »	»)
1 »	»	» 1 »	— № 10	(10 »	»)
1,1 »	»	» 1 »	— № 11	(11 »	»)

Оптические стандарты изготовляет Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича.

Полученную взвесь сравнивают с одним из оптических стандартов. В случае необходимости ее разводят, прибавляя физиологический раствор до нужной мутности. Сравнивая мутность полученной взвеси с оптическим стандартом, определяют количество находящихся в ней микробных тел.

Пример. Если животному нужно ввести 100 млн. микробных тел, полученную взвесь сравнивают со стандартом № 10 (1 млрд. микробных тел), доводят до соответствующей мутности и вводят 0,1 мл взвеси, что соответствует 100 млн. микробных тел.

Для определения DLm из полученной бактерийной взвеси после определения количества содержащихся в ней бактерий делают ряд последовательных разведений — двух- или десятикратных — и каждую дозу вводят нескольким животным. То разведение, которое приводит к гибели большинство животных, и есть DLm данного микроорганизма.

Контрольные вопросы

1. Что означают понятия: вирулентность, токсигенность, токсичность?
2. Какими условными обозначениями пользуются для определения вирулентности, токсигенности, токсичности?
3. Что такое стандарты мутности?
4. Какие Вы знаете стандарты мутности и как ими пользоваться?

Задание. Приготовьте взвесь бактерий и путем последовательных разведений и сравнения со стандартом мутности получите 0,9 млн. микробных тел в 1 мл.

Часть II. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Цель занятий: ознакомить учащихся с основными свойствами изучаемых возбудителей инфекционных заболеваний, способами сбора материала и основными методами микробиологических исследований.

ПАТОГЕННЫЕ КОККИ

Кокки — обширная группа микроорганизмов, включающая патогенных и непатогенных представителей различных семейств и родов.

Стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки относятся к группе патогенных.

Объединяющим признаком патогенных кокков является способность вызывать образование гноя, поэтому они называются гноеродными, или пиогенными.

Глава 7. СТАФИЛОКОККИ

Семейство микрококков, род Staphylococcus.

Патогенные стафилококки впервые описаны Пастером в 1871 г.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ СТАФИЛОКОККАМИ

1. Фурункулы, карбункулы, панариции, абсцессы.
2. Воспалительные процессы различных органов и тканей: ангины, циститы, пиелиты, остеомиелиты, холециститы, маститы и т. п.
3. Вторичные инфекции при заболеваниях, обусловленных другими микроорганизмами; осложнения при ранениях и т. д.
4. Сепсис и септикопиемия.

5. Пищевые токсикоинфекции.

Основными воротами стафилококковой инфекции являются поврежденная кожа и слизистая оболочка.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Стафилококки имеют шаровидную форму, размер каждого кокка 0,8—1 мк, располагаются скоплениями, похожими на гроздь винограда. Такая форма является результатом деления микробов в различных плоскостях. Однако в гное могут встречаться единичные и парные кокки(см. рис. 1—I—1).

Стафилококки неподвижны, не образуют капсул и спор, грамположительны. Факультативные аэробы. Образуют экзо- и эндотоксин и ферменты патогенности.

Стафилококковый **экзотоксин** обладает следующими свойствами: 1) **гемолитическим** (гемотоксин) — вызывает гемолиз эритроцитов; 2) **некротическим** (некротоксин) — вызывает некроз кожи кролика при внутрикожном введении; 3) **летальным** — вызывает гибель кролика; 4) стафилококк образует термоустойчивый **энтеротоксин,** который является причиной пищевых отравлений.

Ферменты патогенности

1. Коагулаза — коагулирует плазму крови.
2. Гиалуронидаза — фактор распространения, разрушает межклеточное вещество соединительной ткани.
3. Лецитиназа — обнаруживается только у патогенных стафилококков при посеве их на яичные среды.

Указанные выше ферменты обусловливают патогенность стафилококка.

Контрольные вопросы

1. По какому признаку патогенные кокки объединены в одну группу?
2. Какие заболевания вызывают стафилококки?
3. Назовите основные ворота стафилококковой инфекции?
4. Какую форму имеют стафилококки и как они окрашиваются по Граму?
5. Какие токсины образует патогенный стафилококк?
6. Какими свойствами обладает стафилококковый экзотоксин?
7. Какие ферменты обусловливают патогенность стафилококков?

Задание. Получите у преподавателя баночку или пробирку с гноем, сделайте мазок, зафиксируйте и окрасьте по Граму. Изучите окрашенный препарат под микроскопом, зарисуйте в тетрадь цветными карандашами и покажите преподавателю.

Культуральные свойства

Стафилококки нетребовательны к питательным средам. Растут при температуре 37° и pH 7,2—7,4. Эти микробы могут размножаться на обычных питательных средах. На МПА колонии стафилококка выпуклые, круглые, блестящие, с ровными краями, диаметр их 2—2,5 мм. Колонии имеют различный цвет — золотистый, лимонно-желтый, белый, что зависит от образования пигмента, которое интенсивнее в присутствии кислорода при комнатной температуре и рассеянном свете.

Элективной средой для выращивания стафилококков служит молочно-солевой агар. На агаре с кровью стафилококки образуют зону гемолиза, на бульоне — равномерную муть и осадок.

Биохимические свойства

Углеводы: лактозу, сахарозу и маннит — стафилококки расщепляют с образованием кислоты; молоко — створаживают; желатин — медленно разжижают (в течение 2—3 дней).

КЛАССИФИКАЦИЯ СТАФИЛОКОККОВ

Патогенность стафилококков долгое время связывали с их пигментами. Золотистые стафилококки считали патогенными, а белые — непатогенными. Однако такая классификация не всегда давала возможность правильно определить патогенность.

В настоящее время принята классификация Гросса, согласно которой все стафилококки разделяют на три группы (табл. 18):

1) патогенные,
2) условно патогенные,
3) непатогенные.

В основу этой классификации положены 3 свойства стафилококков:

1) коагуляция плазмы крови;
2) гемолиз эритроцитов;
3) образование некроза при внутрикожном введении.

Дополнительным показателем патогенности является наличие у штаммов стафилококка фермента **лецитиназы.** Для выявления лецитиназы исследуемую культуру засе-

Таблица 18

Показатели патогенности стафилококка

Классификация стафилококков	Плазмокоагуляция	Гемолиз на чашках с агаром, содержащим 5% крови	Некроз при внутрикожном введении кролику
Патогенные	Коагуляция плазмы в течение 2 часов	Четкая зона гемолиза	Некроз кожи (иногда сопровождающийся гибелью кролика)
Условно патогенные	Коагуляция плазмы не позднее 6—8 часов	Зона гемолиза слабо выражена	Покраснение кожи или воспалительный инфильтрат без некроза
Непатогенные	Отсутствие коагуляции плазмы	Отсутствие гемолиза	Небольшое покраснение кожи

вают на желточно-солевую среду (см. стр. 125). Через 18—24 часа роста вокруг колонии патогенных стафилококков образуется зона помутнения.

При дифференциации патогенных стафилококков от непатогенных пользуются также средой Чепмена — агар с кристаллфиолетовым индикатором (см. стр. 126). На этой среде, патогенные стафилококки растут в виде фиолетовых колоний. Непатогенные стафилококки образуют колонии белого цвета либо не растут совсем.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Среди бактерий, не образующих спор, стафилококки являются наиболее устойчивыми к воздействию физических и химических факторов. Поэтому они часто обнаруживаются в почве, воздухе, на коже и т. д.

При температуре 70° стафилококки погибают в течение 2 часов, при 80° — за 10 минут, при 100° — моментально.

Низкие температуры стафилококки переносят хорошо. В высушенном состоянии могут сохраняться годами.

Применяемые обычно растворы дезинфицирующих веществ: 3—5% раствор фенола, раствор сулемы 1 : 1000, а

также другие дезинфицирующие вещества — убивают стафилококк за 10—20 минут.

В случаях, когда производят обезвреживание выделений, содержащих белок (гной, мокрота и т. д.), не следует применять растворы фенола. Это дезинфицирующее вещество сворачивает белки, что предохраняет микроорганизмы от гибели.

Контрольные вопросы

1. На каких средах выращивают стафилококки и какая среда является для них элективной?
2. На какой среде и при каких условиях пигментообразование более интенсивно?
3. Какова современная классификация стафилококков и какие признаки положены в основу этой классификации?
4. Какой Вы знаете дополнительный показатель патогенности стафилококков?

Задание. Заполните форму № 9, указав характер роста, биохимические свойства и отношение стафилококков к физическим и химическим факторам.

Материалом для исследования являются: 1) гной — при фурункулах, карбункулах, абсцессах,
2) слизь из зева — при ангинах,
3) мокрота — при пневмониях,
4) моча — при пиелитах и циститах,
5) дуоденальное содержимое — при холециститах,
6) кровь — при подозрении на сепсис,
7) рвотные массы, промывные воды желудка, пищевые продукты — при пищевых отравлениях.

Форма № 9

Рост на средах				Биохимические свойства					Отношение к физическим и химическим факторам					
									температура					
МПА	молочно-солевая среда	агар с с кровью	бульон	лактоза	сахароза	маннит	молоко	желатин	70°	100°	ниже нуля	высушивание	3—5% фенол	1:1000 сулема

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение стафилококков и изучение их патогенности

Характеристика материала	Способ сбора материала
Гной из пораженных участков	Материал следует брать из глубоких слоев пораженного участка. При наличии открытых процессов гной берут стерильным тампоном, пастеровской пипеткой или платиновой петлей. При закрытых абсцессах материал берут при помощи стерильного шприца.*
Отделяемое слизистых оболочек зева, носа	Материал собирают стерильным тампоном
Мокрота	Собирают в стерильную посуду
Моча	Собирают в стерильную посуду (следует брать утреннюю мочу катетером)
Дуоденальное содержимое	В стерильные пробирки собирают порции А, В и С (можно все 3 порции в одну посуду)
Кровь	10—15 мл берут стерильно из локтевой вены
Рвотные массы	Собирают в стерильную посуду
Промывные воды желудка	» »

* Примечание. Раневую поверхность предварительно очищают стерильным ватным тампоном.

Форма № 10

Материал для исследования	В стерильную посуду			Стерильными			Стерильным шприцем
	колбы	баночки	пробирки	тампоном	петлей	пастеровской пипеткой	

Контрольный вопрос

Какой материал исследуют при заболеваниях, вызываемых стафилококком.

Задание. Заполните форму № 10, указав способы сбора материала (тампоном, петлей, пипеткой, шприцем).

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основные методы исследования

1. Микроскопический.
2. Микробиологический.
3. Биологический.

Характеристика материала	Методика исследования
	Первый день исследования
Гной	Засевают на молочно-солевой агар в чашках Петри, на агар с 3—5% крови в чашках Петри и на бульон с глюкозой (1—2%) в пробирках (среда обогащения). Параллельно из гноя делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.
Отделяемое слизистых оболочек	Засевают на молочно-солевой агар.
Моча	Центрифугируют, полученный осадок засевают на молочно-солевой агар. Делают мазки. Окрашивают по Граму и микроскопируют.
Мокрота, дуоденальное содержимое	Засевают на молочно-солевой агар.
Рвотные массы и пищевые продукты	Рвотные массы и пищевые продукты предварительно растирают в ступке и эмульгируют в стерильном физиологическом растворе. 1—2 мл эмульсии засевают на молочно-солевой агар. Для получения изолированных колоний при посевах на чашки Петри исследуемый материал тщательно втирают шпателем в поверхность среды.
Кровь	Засевают на бульон с 0,2—0,25% глюкозы в соотношении 1:10. Все посевы ставят в термостат на сутки. Обнаружение стафилококков при микроскопии гноя из закрытого абсцесса и осадка мочи, взятой катетером, позволяет дать предварительный положительный ответ: выделен стафилококк.

Характеристика материала	Методика исследования
	Второй день исследования Посевы на плотных и жидких питательных средах вынимают из термостата и изучают. Подозрительные в отношении стафилококка колонии (см. стр. 117), выросшие на молочно-солевом агаре, отсевают на скошенный агар для выделения и дальнейшего изучения чистой культуры. Чашки с оставшимися колониями оставляют на 2—3 дня при комнатной температуре для выявления пигмента. Просматривают посевы на чашках с агаром, содержащим кровь. Колонии с четкой зоной гемолиза (просветления) вокруг них выделяют на скошенный агар. При отсутствии роста на плотных питательных средах делают высев из бульона с глюкозой на агар с кровью. Посевы ставят в термостат на сутки. **Третий день исследования** Вынимают посевы из термостата. Из выделенных на скошенный агар культур делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамположительных стафилококков проводят дальнейшее изучение выделенной культуры: 1) ставят реакцию плазмокоагуляции; 2) изучают гемолитические свойства; 3) проводят дермонекротическую пробу; 4) проводят выявление фермента лецитиназы; 5) делают посев на среду Чепмена; 6) делают посев на среды Гисса. 1. **Постановка реакции плазмокоагуляции.** Плазму, полученную из крови кролика, разводят физиологическим раствором в соотношении 1:4 и наливают в две преципитационные пробирки по 0,3—0,5 мл. В одну пробирку вносят петлю исследуемой культуры; другая пробирка служит контролем. Обе пробирки ставят в термостат при температуре 37°. Учет реакции производят через 2 часа. При отсутствии свертывания плазмы проверяют результат опыта через 6 часов; окончательно учет производят через 18 часов. При наличии фермента коагулазы плазма свертывается (не выливается из перевернутой пробирки). В контрольной пробирке консистенция плазмы не изменяется. 2. Для выявления гемолитических свойств производят посев на агар с 5% крови (табл. 19).

Продолжение

Характеристика материала	Методика исследования
	3. Дермонекротическую пробу ставят следующим образом. Кролику весом 2—2,5 кг выщипывают на спине или на боку шерсть и вводят внутрикожно 0,2 мл микробной взвеси, в 1 мл которой содержится 2 млрд. микробных тел. Таким образом, кролику вводят 400 млн. микробных тел. Учет производят через 24—48 часов. 4. Пробу на лецитиназу производят, делая посев исследуемой культуры на желточно-солевую среду. 5. Производят посев на среду Чепмена. 6. Делают посев на среды Гисса (лактозу, глюкозу, сахарозу и маннит). Все посевы ставят в термостат. 7. Учитывают реакцию плазмокоагуляции. Четвертый день исследования 1. Вынимают посевы из термостата и учитывают результат. 2. Осматривают место введения исследуемого материала у кролика.

Таблица 19

Свойства выделенной культуры

Выделена культура	Реакция плазмокоагуляции через			Гемолиз эритроцитов	Дермонекротическая проба	Проба на лецитиназу	Посев на среду Чепмена	Среды Гисса			
	2—3 часа	6 часов	18 часов					лактоза	глюкоза	сахароза	маннит
Патогенный стафилококк	+			+	Некроз (через 48 час)	Вокруг колоний зона помутнения	Колонии фиолетового или оранжевого цвета	К	К	К	К

Условные обозначения: К — образование кислоты; + положительная реакция.

Наличие перечисленных признаков позволяет отдифференцировать патогенные стафилококки от непатогенных и дать окончательный ответ. Вспомогательным мето-

дом идентификации патогенных стафилококков является фаготипирование. Фаготипирование может также подтвердить идентичность стафилококков, выделенных от разных больных и из объектов внешней среды (например, при эпидемических вспышках).

Для фаготипирования используют критические тест-разведения фагов. Критическим тест-разведением называют то максимальное разведение фага, при котором происходит полный лизис соответствующего штамма стафилококка.

Методика фаготипирования. В чашку Петри наливают 20 мл 1,5% мясо-пептонного агара, дают ему застыть и подсушивают в термостате в течение 30—40 минут. На поверхность агара наносят 1 мл 4—6-часовой культуры выделенного стафилококка, распределяют по поверхности всей чашки, избыток жидкости отсасывают или дают ей испариться в термостате в открытой чашке. Предварительно дно чашки делят на секторы или квадраты. Число квадратов или секторов должно соответствовать количеству используемых фагов (пользуются набором типовых фагов; в набор входит 21 фаг). Затем на каждый квадрат или сектор наносят один фаг.

Чашки ставят в термостат при температуре 37°.

Результаты определяют через 6—7 часов. Если чашки оставляют при комнатной температуре, то учет фаголизиса производят через 18—24 часа.

Результат учитывают следующим образом: при сливном лизисе ++++; если на сливном лизисе отмечается вторичный рост, +++; наличие около 50 негативных колоний ++.

В некоторых случаях приходится определять наличие летального- и энтеротоксина выделенной культуры стафилококка.

Для выявления летального токсина кролику внутривенно или внутрибрюшинно вводят фильтрат бульонной культуры стафилококка из расчета 0,1—0,2 мл фильтрата на 1 кг веса кролика.

Гибель кролика (через 3—4 дня) свидетельствует о наличии летального токсина.

Для определения энтеротоксина котятам, очень чувствительным к нему, вводят исследуемый материал (остатки пищи) per os.

Если исследуемый продукт котята не едят, из него готовят взвесь в дистиллированной воде (1 : 1) и вводят в

рот с помощью пипетки или ложечки. Реакцию считают положительной, если рвота и понос наступают в течение 30—60 минут. При отсутствии рвоты и поноса в течение этого времени результат биологической пробы считают отрицательным (рвота, появляющаяся через 5—10 минут неспецифична).

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные методы лабораторного исследования для выявления стафилококков.
2. Какие реакции необходимо поставить при обнаружении грамположительных стафилококков?
3. Расскажите методику постановки реакции плазмокоагуляции.
4. На какой среде выявляют гемолитические свойства стафилококков?
5. На каком животном ставят дермонекротическую пробу?
6. С какой целью проводят фаготипирование?
7. На каких животных определяют летальный энтеротоксин.

Задание. Получите у преподавателя пробирку с исследуемым материалом. Приготовьте необходимые для посева среды (см. стр. 125, 126). Произведите посев и поставьте в термостат. Возьмите у преподавателя плазму и поставьте реакцию плазмокоагуляции.

Заполните форму № 11, указав этапы бактериологического исследования по дням.

Форма № 11

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Молочно-солевая среда (среда Петрович). К мясо-пептонному агару добавляют 5—7% поваренной соли, устанавливают реакцию среды pH 7,2—7,4 и стерилизуют. Перед посевом агар растапливают и добавляют 10% стерильного, хорошо обезжиренного молока. Тщательно размешивают и стерильно разливают в чашки Петри.

Желточно-солевая среда (среда Чистовича). Готовят желточную смесь (1 желток на 150 мл стерильного физиологического раствора). К мясо-пептонному агару, приготовленному по обычной прописи, добавляют 20% желточной взвеси (соблюдая стерильность) и разливают в чашки.

Среда Чепмена. К 1 л 3,5% мясо-пептонного агара прибавляют 3,3% мл 0,1% водного раствора кристалл-фиолетового.

Агар с кровью (см. стр. 56).

Агар с глюкозой (см. стр. 56).

Среды Гисса (см. стр. 56).

Солевой бульон. К мясо-пептонному бульону добавляют 5—7% поваренной соли, устанавливают реакцию среды pH 7,2—7,4, разливают по пробиркам и стерилизуют.

Глава 8. СТРЕПТОКОККИ

Семейство лактобацилл, род Streptococcus. Стрептококки впервые описаны Бильротом в 1874 г.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ СТРЕПТОКОККАМИ

Как гноеродные бактерии стрептококки могут вызывать воспалительные и гнойные процессы в разных органах и тканях:

1. Ангины.
2. Рожа.
3. Абсцессы, флегмоны, карбункулы и т. д.
4. Нефрит, ревмокардит, эндокардит. Поступая в кровь, стрептококк током крови заносится во внутренние органы. При эндокардите особую роль играет зеленящий стрептококк.
5. Сепсис. Стрептококк часто является возбудителем сепсиса и септикопиемии.
6. Гемолитический стрептококк считают возбудителем скарлатины.

Основными воротами стрептококковой инфекции являются поврежденнные кожа или слизистая оболочка.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Стрептококки — это кокки, расположенные цепочкой (длина цепочки различная). Культуры стрептококков, выращенные на плотных питательных средах, образуют обычно короткие цепочки, на жидких — длинные.

Величина каждого кокка 0,6—1 мк в диаметре (см. рис. 1—1—2).

Для стрептококков характерен полиморфизм. Встречаются мелкие и крупные стрептококки, строго шарообразной формы, иногда отдельные кокки уплощены или вытянуты даже в одной цепочке.

Стрептококки неподвижны, не образуют спор, в свежевыделенной культуре иногда имеют капсулу. Грамположительны. Образуют эндо- и экзотоксин, а также ферменты патогенности. Стрептококковый экзотоксин обладает различными по своему проявлению свойствами, каждое из которых характеризует изучаемую культуру.

Свойства стрептококкового экзотоксина

1. **Стрептолизин** вызывает гемолиз эритроцитов.
2. **Лейкоцидин** разрушает лейкоциты.
3. **Некротоксин** при внутрикожном введении животному (кролику) вызывает некроз кожи.
4. **Летальный токсин** при парентеральном введении вызывает гибель животного.
5. **Эритрогенный токсин** вызывает реакцию сосудов кожи (гиперемию, эритему).

Ферменты патогенности

1. Гиалуронидаза — фактор проникновения (см. Стафилококки).
2. Фибринолизин лизирует сгустки фибрина.
3. Дезоксирибонуклеаза расщепляет дезоксирибонуклеиновую кислоту клетки.

Контрольные вопросы

1. Какие заболевания вызывают стрептококки?
2. Назовите основные ворота стрептококковой инфекции.
3. Какова форма стрептококков и как они окрашиваются по Граму?
4. Какие токсины образуют патогенные стрептококки?
5. Какими свойствами обладает стрептококковый экзотоксин?
6. Какие ферменты обуславливают патогенность стрептококков?

Задание. Получите у преподавателя культуру стрептококка, выращенную на плотной и жидкой питательной среде. Сделайте 2 мазка (один из культуры с жидкой, другой — с плотной питательной среды), зафиксируйте оба мазка, окрасьте по Граму и изучите под микроскопом. Зарисуйте в тетрадь цветными карандашами и покажите преподавателю. Обратите внимание на длину стрептококковых цепочек!

Культуральные свойства

Стрептококки — факультативные аэробы. Растут при температуре 37° и pH среды 7,2—7,4. Оптимальными средами для развития стрептококков являются среды, содержащие сахара и сыворотку.

На агаре с глюкозой («сахарный агар») стрептококки растут в виде мелких серо-белых колоний размером 0,5—1 мм.

На агаре с кровью большинство разновидностей стрептококка образует зону гемолиза. Зеленящий стрептококк образует вокруг колонии зеленую зону.

На бульоне с глюкозой («сахарный бульон») стрептококки растут, образуя пристеночный и придонный мелкозернистый осадок; бульон при этом остается прозрачным.

Биохимические свойства

Углеводы (лактоза, глюкоза, сахароза, маннит и мальтоза) стрептококки ферментируют с образованием кислоты; молоко свертывают, желатин не разжижают (большинство разновидностей).

КЛАССИФИКАЦИЯ СТРЕПТОКОККОВ

Одна из первых классификаций стрептококков предложена Шотмюллером. В ее основу положено разделение стрептококков по наличию **гемолитических свойств,** которые считали критерием патогенности. Дальнейшее изучение стрептококков показало, что и непатогенные стрептококки нередко обладают способностью вызывать гемолиз. Поэтому в настоящее время в основу классификации положена антигенная структура стрептококка, которую изучают с помощью серологических методов исследования.

При изучении антигенной структуры из микробной клетки были выделены несколько фракций: нуклеопротеидная, протеиновая и полисахаридная — группоспецифическая фракция.

Ленсфильд по характеру (составу) полисахаридной группоспецифической фракции разделила все стрептококки на 17 групп, обозначаемых большими буквами латинского алфавита от A до N.

Каждая из серологических групп включает ряд серологических типов.

Группа А включает 47 типов (в эту группу входит большинство патогенных стрептококков, вызывающих различные заболевания у человека).

Группа В охватывает только небольшую часть патогенных для человека стрептококков.

Группа С включает патогенных для человека и животных стрептококков.

Группа D в основном состоит из непатогенных для человека стрептококков. Однако в эту группу входят энтерококки, которые являются обитателями кишечного тракта человека и теплокровных. В других органах эти микроорганизмы обусловливают воспалительные процессы: холециститы, пиелиты и т. д. Таким образом, энтерококки можно отнести к группе условно патогенных микробов.

Обнаружение энтерококков в пищевых продуктах является показателем фекального загрязнения.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

К физическим и химическим факторам стрептококки достаточно устойчивы, особенно энтерококки. При температуре 70° стрептококки погибают через 30 минут, энтерококки — только через час. К низким температурам и высыханию все стрептококки устойчивы.

Обычные концентрации дезинфицирующих растворов губят их через 15—20 минут. Энтерококки погибают через 40—50 минут.

К веществам, избирательно действующим на грамположительные кокки (антибиотик пенициллин), энтерококки нечувствительны.

Контрольные вопросы

1. На каких средах выращивают стрептококки и какая является средой накопления?
2. Расскажите о современной классификации стрептококков и принципах ее создания.
3. На какие серологические группы делят стрептококки?
4. Какие типы стрептококков наиболее патогенны для человека и какие заболевания они вызывают?
5. Какой из представителей стрептококков является наиболее устойчивым к физическим и химическим факторам внешней среды и к какой группе микроорганизмов его относят?

Форма № 12

Рост на средах			Биохимические свойства							Устойчивость к физическим и химическим факторам		
агар с глюкозой	агар с кровью	бульон с глюкозой	лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	желатин	молоко	температура 70°	высыхание	3—5% фенол

Задание. 1. Заполните форму № 12, указав характер роста, биохимическую активность и устойчивость стрептококков к физическим и химическим факторам.

2. Возьмите у преподавателя чашку со стрептококком, выращенным на агаре с кровью. Изучите колонии и зону гемолиза вокруг них, зарисуйте в тетрадь цветными карандашами и покажите преподавателю.

Выбор материала для исследования зависит от локализации воспалительного процесса.

Материалом для исследования может служить:

1) отделяемое слизистой оболочки зева при ангинах и скарлатине;
2) соскоб с пораженного участка кожи;
3) гной при абсцессах;
4) моча при нефритах;
5) кровь при подозрении на сепсис, эндокардит.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение стрептококка и определение его патогенности.

Характер материала	Способ сбора материала
Отделяемое слизистой оболочки	Сбор материала производится стерильным ватным тампоном.

Продолжение

Характер материала	Способ сбора материала
Соскоб с пораженного участка кожи	При взятии материала с кожи тампон предварительно смачивают физиологическим раствором.
Гной при открытых абсцессах	Собирают стерильным ватным тампоном.
Гной из закрытых абсцессов	Берут стерильным шприцем.
Кровь	10—15 мл крови берут стерильным шприцем из локтевой вены.
Моча	Собирают в стерильную посуду, желательно катетером.

Контрольный вопрос

Какой материал исследуют?

Задание. Заполните форму № 13, указав способы сбора исследуемого материала.

Форма № 13

В стерильную посуду, колбу, пробирку, баночку	Стерильными тампоном, петлей, пастеровской пипеткой	Стерильным шприцем

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основные методы исследования

1. Микроскопический.
2. Микробиологический.
3. Серологический (определение серологического типа).

Характеристика материала	Методика исследования
	Первый день исследования
Слизь Соскоб с пораженного участка кожи	Производят посев на агар с 5% крови, вращая тампон по поверхности питательной среды. После посева на плотную питательную среду тампон ополаскивают в бульоне с 1% глюкозы, который является средой накопления.
Гной	Каплю гноя наносят на агар с 5% крови в чашках Петри и стеклянным шпателем втирают в среду. Из этого же материала делают мазок на предметном стекле, окрашивают по Граму и микроскопируют.
Моча	Центрифугируют, осадок засевают на агар с 5% крови. Из осадка делают также мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют.
Кровь	Производят посев на бульон с 0,2% глюкозой в отношении 1:10. При подозрении на эндокардит производят посев крови по методу Кассирской в 3 флакона по 3—4 мл. Первый флакон содержит полужидкий агар (0,2%) с 10% сыворотки крови. Второй флакон содержит бульон Левинталя с 5% дефибринированной крови. В третьем флаконе — печеночная среда Тароцци. Посев крови во флаконы производят у постели больного. Все флаконы помещают в термостат при 37°.
	Второй день исследования
	Вынимают чашки из термостата и просматривают. При наличии подозрительных колоний из части их делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении в мазке стрептококков часть оставшейся колонии пересевают в пробирки на агар с сывороткой для выделения чистой культуры и на бульон с кровью в пробирках. К концу дня 5—6-часовую культуру из бульона или агара пересевают на бульон Мартена с 0,25% глюкозы для постановки реакции преципитации по Ленсфильд. Пробирки и флаконы помещают в термостат и оставляют до третьего дня.
	Третий день исследования
	1. Вынимают посевы из термостата, проверяют чистоту культуры на скошенном агаре; делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии чистой культуры стрептококка производят посев на среды Гисса (глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит и мальтозу), молоко, желатин, 40% желчь и ставят в термостат (табл. 20).

Характеристика материала	Методика исследования
	2. Просматривают бульон Мартена: при наличии специфического роста (см. стр. 128) ставят реакцию преципитации по Ленсфильд для определения серотипа выделенной культуры. 3. Из каждого флакона с кровью производят высев на агар с 0,5% крови в чашках Петри. Четвертый день исследования Если на чашках вырастают подозрительные колонии, их пересевают на скошенный агар для выделения чистой культуры, дальнейшее исследование ведут по общей схеме. При отсутствии роста на чашках флаконы с кровью выдерживают в термостате $1\,^1/_2$—2 месяца с последующими пересевами через каждые 2 дня на агар с кровью. **Постановка реакции преципитации** (по Ленсфильд). Суточную культуру, выросшую на мартеновском бульоне, разливают в несколько центрифужных пробирок, центрифугируют в течение 10—15 минут (при 3000 оборотов в минуту). Надосадочную жидкость сливают в банку с дезинфицирующим раствором, а осадок заливают стерильным физиологическим раствором и вновь центрифугируют. Осадок из всех центрифужных пробирок переносят в одну пробирку и прибавляют 0,4 мл 0,2% соляной кислоты. Затем пробирку помещают на водяную баню и кипятят 15 минут, периодически встряхивая. После кипячения полученную взвесь вновь центрифугируют. Антиген при этом экстрагируется в надосадочную жидкость, которую сливают в чистую пробирку и нейтрализуют 0,2% раствором едкого натра до pH 7,0—7,2. В качестве индикатора прибавляют бромтимолблау (0,01 мл 0,04% раствора). При указанной реакции цвет меняется от соломенно-желтого до голубого. Затем в 5 центрифужных пробирок разливают по 0,2 мл антистрептококковых групповых сывороток, которые готовят иммунизацией кроликов (см. гл. 6): в 1-ю — сыворотку A, во 2-ю — сыворотку B, в 3-ю — сыворотку C, в 4-ю — сыворотку D, в 5-ю — физиологический раствор (контроль). Затем пастеровской пипеткой во все пробирки по стенке осторожно наслаивают полученный экстракт (антиген). При положительной реакции в пробирке с гомологичной сывороткой на границе экстракта и сыворотки образуется тонкое молочно-белое кольцо.

Таблица 20

Учет ферментативных свойств стрептококков

Вид культуры	Расщепление углеводов					Рост на желчи	Молоко	Желатин
	лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза			
Стрептококк группа А	К	К	+	+	+	—	Свертывает	Не разжижает

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные методы лабораторного исследования для выделения стрептококков.

2. Для чего ставят реакцию преципитации по Ленсфильд?

3. Объясните, почему антиген при постановке этой реакции должен быть прозрачным?

4. Опишите технику постановки реакции преципитации.

Задание. 1. Получите у преподавателя антистрептококковые сыворотки A, B, C и D, физиологический раствор и антиген. Поставьте реакцию преципитации. Пробирку, в которой образуется кольцо преципитации, покажите преподавателю.

2. Заполните форму № 14, указав схему микробиологического исследования по дням.

Форма № 14

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Агар с глюкозой («сахарный») (стр. 56).

Агар с кровью (стр. 56).

Агар с сывороткой (стр. 56).

Среды Гисса (стр. 56).

Желатин. К 100 мл мясопептонного бульона прибавляют 10—15 г мелко нарезанного желатина. Желатин должен набухнуть и раствориться при медленном нагре-

вании в водяной бане (при температуре 40—45°). К расплавленному желатину прибавляют 10% питьевой соды и устанавливают pH 7,0. Затем среду фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрование идет медленно. Для ускорения процесса фильтрацию можно производить в горячем автоклаве. Профильтрованную среду разливают в пробирки по 6—8 мл и стерилизуют. Стерилизацию производят либо дробно при температуре 100° 3 дня подряд, либо одномоментно при 110° 20 минут в автоклаве. Охлаждение среды проводят в пробирках, поставленных вертикально.

Приготовление молока. Свежее молоко доводят до кипения, ставят в прохладное место на сутки, освобождают от сливок, вновь кипятят. Оставляют на сутки и снимают верхний слой. Обезжиренное молоко фильтруют через слой ваты, затем подщелачивают 10% раствором углекислого натрия до pH 7,2 и разливают в пробирки по 5—6 мл.

Бульон Мартена. К мясной воде (стр. 49) прибавляют пептон Мартена (фарш из свиных желудков, подвергшийся воздействию соляной кислоты) в равных количествах. Полученную смесь кипятят 10 минут, подщелачивают 10% раствором едкого натра до pH 8,0, добавляют 0,5% уксуснокислого натрия, вновь кипятят и разливают в стерильную посуду.

К бульону Мартена прибавляют 0,25% глюкозы.

Среда Тароцци (см. стр. 64).

Глава 9. ПНЕВМОКОККИ

Семейство лактобацилл, род Diplococcus. Пневмококки были впервые описаны Р. Кохом в 1871 г.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ПНЕВМОКОККАМИ

1. Крупозная пневмония.
2. Ползучая язва роговицы.
3. Отит.
4. Пневмококки могут вызывать и другие заболевания: плеврит, ангины, менингит, абсцессы и т. д.

Основными воротами инфекции является слизистая оболочка дыхательных путей, глаз и уха.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Пневмококки — диплококки, у которых стороны клеток, обращенные друг к другу, уплощены, а противоположные вытянуты и напоминают ланцет. Поэтому пневмококк называют «ланцетовидный диплококк» (см. рис. 1—I—3).

Размер пневмококков 0,75—1,5×0,5—1 мк. Пневмококки располагаются обычно парами, однако при культивировании на жидких питательных средах могут образовывать короткие цепочки, приобретая сходство со стрептококками.

Пневмококки неподвижны, не имеют спор. В организме человека или животного образуют капсулу, окружающую оба кокка. При расположении цепочкой капсула может быть общей для всей цепочки. На искусственных питательных средах пневмококки утрачивают капсулу.

Пневмококки грамположительны, капсула при окраске по Граму остается бесцветной. В капсуле содержится термоустойчивое вещество антифагин, который защищает пневмококк от фагоцитоза и антител.

Пневмококки образуют **эндотоксин**, обладающий слабо выраженными гемолитическим и фибринолитическим свойствами и фермент **гиалуронидазу**.

Наличие этих факторов обусловливает патогенность пневмококка.

Контрольные вопросы

1. Какие заболевания вызывают пневмококки?
2. Назовите основные ворота пневмококковой инфекции.
3. Опишите форму, величину и расположение пневмококков и как они окрашиваются по Граму.
4. Как защищен пневмококк от фагоцитоза и действия иммунных антител?
5. Какие факторы обусловливают патогенность пневмококков?

Культуральные свойства

Пневмококки — факультативные аэробы, растут при температуре 36—37° и pH среды 7,2—7,4. К питательным средам очень требовательны: размножаются только при прибавлении к среде нативного белка (крови или сыворотки).

Рост на средах. На агаре с сывороткой (см. стр. 56) пневмококки образуют мелкие, нежные, чуть желтоватые прозрачные колонии.

На агаре с кровью вырастают мелкие, влажные колонии зеленовато-серого цвета, окруженные зеленоватой зоной, вследствие превращения гемоглобина крови в метгемоглобин.

На бульоне с сывороткой пневмококки образуют муть и легкий пылевидный осадок на дне.

Биохимические свойства

Углеводы — лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу и инулин — пневмококки расщепляют; молоко свертывают; желатин не разжижают.

В 40% желчи патогенные пневмококки растворяются.

Расщепление инулина и растворение в желчи является важным диагностическим и дифференциальным признаком пневмококков, отличающим их от стрептококков.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПНЕВМОКОККОВ

Состав полисахаридной фракции пневмококков различен, и на этом основании пневмококки можно разделить на ряд типов (около 70). Вирулентными для человека являются первые 3 типа, обозначаемые римскими цифрами I, II и III. Третий тип пневмококка характеризуется резко выраженной капсулой, остальные типы пневмококков объединены в IV группу и являются условно патогенными для человека.

Контрольный вопрос

По какому признаку делят пневмококки на типы и какие типы вирулентны для человека?

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Пневмококки относятся к группе нестойких микробов.

При температуре 55° микроорганизмы погибают через 10 минут, при 60° — через 2—3 минуты.

Низкие температуры и высушивание также оказывают губительное действие на пневмококки, однако, высушенные в белках (крови, мокроте), они могут сохраняться до $1^1/_2$—2 месяцев. На питательных средах сохраняются не более 5—7 дней, поэтому при культивировании на ис-

кусственных питательных средах необходимо делать пересевы через каждые 2—3 дня.

Обычные концентрации дезинфицирующих растворов убивают пневмококков в течение нескольких минут (например, 3% раствор фенола). Особенно чувствительны пневмококки к оптохину, который в разведении 1 : 100 000 убивает эти микроорганизмы.

Контрольный вопрос

Какие пробы при изучении пнемококков являются диагностически дифференциальными?

Задание. Заполните форму № 15, указав характер роста, биохимические свойства и отношение пневмококков к физическим и химическим факторам.

Форма № 15

Рост на средах				Биохимические свойства							Устойчивость к физическим и химическим факторам			
агар с кровью	агар с сывороткой	бульон с сывороткой	молоко	желатин	лактоза	глюкоза	сахароза	мальтоза	желчь 40%	инулин	температура 60°	низкая температура (10° и ниже)	3% карболовая кислота	оптохин 1 : 100 000

Материалом для исследования являются:

1) мокрота — при пневмониях,
2) слизь из зева — при ангинах,
3) отделяемое из язвы (при ползучей язве роговицы),
4) выделения из уха — при отитах,
5) гной — при абсцессах;
6) плевральный пунктат — при плевритах,
7) кровь — при подозрении на сепсис.

Целью исследования является выделение пневмококка.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Способ сбора материала
Мокрота*	Собирают в стерильную посуду.
Слизь из зева	Собирают стерильным тампоном.
Плевральная жидкость	Берут стерильным шприцем.
Отделяемое из язвы	Берут стерильным ватным тампоном, предварительно смоченным в стерильном физиологическом растворе.
Выделения из уха	
Гной из абсцесса	При открытых абсцессах материал собирают стерильной петлей или стерильным ватным тампоном, при закрытых — стерильным шприцем.
Кровь	Стерильно берут из локтевой вены 5—10 мл крови.

* Примечание. Лучше брать утреннюю мокроту (при специфической пневмонии мокрота имеет ржавый цвет).

Контрольный вопрос

Какой материал исследуют с целью выделения пневмококков?

Задание. Заполните форму № 16, указав способы сбора материала.

Форма № 16

В стерильную посуду			Стерильными			Стерильным шприцем
колбы	баночки	пробирки	тампоном	петлей	пастеровской пипеткой	

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основные методы исследования

1. Биологический.
2. Микроскопический.
3. Микробиологический.

Характеристика материала	Методика исследования
Мокрота	Первый день исследования Мокроту выливают в стерильную чашку Петри, петлей захватывают слизисто-гнойный комочек, растирают его на предметном стекле, высушивают, красят по Граму и микроскопируют. Для лучшего выявления капсулы применяют окраску по методу Бурри. Мокрота содержит разнообразную флору, которая препятствует размножению пневмококка на искусственных питательных средах. Поэтому для выделения чистой культуры используют биологический метод — заражение белых мышей; в их организме, очень чувствительном к пневмококку, этот микроорганизм размножается быстрее, чем другие.
Техника заражения животных	Немного (3—5 мл) мокроты эмульгируют в стерильном бульоне; 0,5 мл этой эмульсии вводят внутрибрюшинно белой мыши. Через 6—8 часов у мыши отмечаются признаки заболевания. В это время уже можно обнаружить пневмококк в экссудате, образовавшемся в брюшной полости. Экссудат берут стерильным шприцем. Из него делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для выделения чистой культуры экссудат засевают на агар с сывороткой. Если мышь погибает или ее забивают, также делают посев крови из сердца на агар с кровью для выделения чистой культуры. Посевы экссудата и крови помещают в термостат. **Феномен набухания капсулы по Нейфельду.** Экссудат используют для получения феномена «набухания капсулы» по Нейфельду. Для этого на предметное стекло наносят 3 капли экссудата и прибавляют к каждой капле антипневмококковую диагностическую сыворотку: к первой капле — сыворотку I типа, ко второй — II типа и к третьей — III типа. После этого к каждой капле смеси добавляют по одной капле метиленового синего, размешивают петлей или концом запаянной пастеровской пипетки каждую каплю в отдельности, покрывают покровным стеклом и микроскопируют с помощью иммерсионной системы. При положительном результате реакции в капле с гомологичной сывороткой происходит резкое набухание капсулы. Таким образом определяют тип пневмококка.

Характеристика материала	Методика исследования
	Постановка реакции микроагглютинации. Тип пневмококка определяют также в реакции микроагглютинации. Для этого 4 капли экссудата из брюшной полости наносят на предметное стекло. К первой капле прибавляют агглютинирующую антипневмококковую сыворотку I типа, ко второй — сыворотку II типа; к третьей — III типа; к четвертой — физиологический раствор (контроль). Сыворотки I и II типа предварительно разводят в соотношении 1:10, а сыворотку III типа — 1:5. Все капли размешивают, высушивают, фиксируют и окрашивают разведенным фуксином. При положительном результате реакции в одной из капель отмечается **склеивание микробов** (агглютинация) **Реакция преципитации.** Если мышь погибает или ее забивают, экссудат брюшной полости можно испытать в реакции преципитации. Для этого брюшную полость погибшей мыши промывают 2—3 мл физиологического раствора; полученный после промывания экссудат центрифугируют. Центрифугат разливают в 3 преципитационные пробирки по 0,5 мл. В первую пробирку наслаивают противопневмококковую сыворотку I типа, во вторую — II типа, в третью — сыворотку III типа. Предварительно сыворотки I и II типа разводят физиологическим раствором в соотношении 1:10, а сыворотку III типа — 1:5. В пробирке, в которую добавлена гомологичная сыворотка, на границе экссудата с сывороткой образуется белое кольцо — **преципитат.** Определение типа пневмококков имеет большое значение для решения эпидемиологических вопросов, а также для лечения специфической сывороткой.
Слизь из зева Отделяемое язвы (при ползучей язве роговицы) Выделения из уха (при отитах) Гной при открытых абсцессах	Слизь из зева, отделяемое язвы, выделения из уха и гной из открытых абсцессов содержат разнообразную флору, поэтому для выделения чистой культуры проводят заражение белой мыши. Тампон с собранным материалом прополаскивают в 1—2 мл стерильного бульона и 0,5 мл вводят двум — трем белым мышам. Дальнейшее исследование ведут как описано выше. Из бульона делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Характеристика материала	Методика исследования
Гной при закрытых абсцессах	Полученный материал центрифугируют. Осадок засевают на бульон с сывороткой и агар с сывороткой в чашках Петри.
Плевральный пунктат	Засевают на бульон с сывороткой в соотношении 1:10; с последующим высевом через каждые 2 дня на агар с сывороткой или кровью в чашках Петри.
Кровь	

Второй день исследования

Посевы вынимают из термостата. Просматривают и из подозрительных колоний (см. стр. 136) делают мазки. При наличии в мазках грамположительных, ланцетовидных диплококков 2—3 колонии выделяют на скошенный агар с сывороткой для получения чистой культуры.

Посевы помещают в термостат.

Третий день исследования

Посевы вынимают из термостата. Проверяют чистоту культуры — делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

При наличии в выделенной культуре грамположительных, ланцетовидных диплококков проводят идентификацию выделенной культуры путем посева:

1) на среды Гисса (лактозу, глюкозу, сахарозу и мальтозу);
2) на инулин;
3) ставят пробу с желчью.

Посев на полужидкие среды Гисса проводят обычным способом — уколом в среду.

Проба на инулин. Исследуемую культуру засевают на питательную среду, содержащую инулин и лакмусовую настойку (стр. 144) и ставят в термостат. Через 18—24 часа посевы вынимают из термостата. При наличии пневмококков среда окрашивается в красный цвет (стрептококки — консистенцию и цвет среды не изменяют) (табл. 21).

Проба с желчью. В две агглютинационные пробирки наливают по 1 мл исследуемой бульонной культуры. В одну из них добавляют каплю кроличьей желчи, вторая пробирка служит контролем. Обе пробирки помещают в термостат. Через 30—40 минут наступает лизис пневмококков, который выражается в просветлении мутного бульона (см. табл. 21). В контроле взвесь остается мутной.

Продолжение

Характеристика материала	Методика исследования
	Пробу с желчью можно поставить на плотной питательной среде. Для этого на колонию пневмококков, выросших на чашках с агаром с сывороткой, наносят крупинку сухой желчи — колония растворяется (исчезает). Четвертый день исследования Учет результатов (см. табл. 21).

Таблица 21

Дифференциация пневмококка от зеленящего стрептококка

Характер культуры	Расщепление углеводов					40% желчь
	лактоза	глюкоза	сахароза	мальтоза	инулин	
Пневмококк	K_1	K	K	K	K	Лизис
Зеленящий стрептококк	K	K	K	K	—	—

[1] K — расщепление углевода с образованием кислоты.

Продолжение

Характеристика материала	Определение вирулентности пневмококков
	Суточную бульонную культуру пневмококка разводят 1% пептонной водой от 10^{-2} до 10^{-8}; 0,5 мл каждого разведения вводят двум белым мышам. Культуру, вызвавшую гибель мышей в разведении 10^{-7}, оценивают как вирулентную; в разведении 10^{-4}—10^{-6} считают средне вирулентной; в разведении 10^{-3} — слабо вирулентной; культура, не вызвавшая гибели мышей, авирулентна.

Контрольные вопросы

1. Какой метод является основным для выделения чистой культуры пневмококков?

2. Какое животное наиболее чувствительно к пневмококку?

3. Какие реакции ставят с экссудатом зараженной мыши и с какой целью?

3. От каких представителей гноеродных кокков следует дифференцировать пневмококк и с помощью какой пробы?

5. Как определяют вирулентность пневмококков?

Задание. Заполните форму № 17, указав этапы микробиологического исследования по дням исследования.

Форма № 17

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Агар с сывороткой (стр. 56).
Бульон с сывороткой (стр. 56).
Агар с кровью (стр. 56).
Среды Гисса (стр. 56).
Желатин (стр. 134).
Молоко (стр. 135).

Среда для пробы с инулином: к 200 мл дистиллированной воды прибавляют 10 мл инактивированной бычьей сыворотки, 18 мл лакмусовой настойки и 3 г инулина. Стерилизуют текучим паром при температуре 100° 3 дня подряд.

Желчный бульон (стр. 56).

Глава 10. МЕНИНГОКОККИ

Семейство нейссериацее, род Neisseria. Менингококк открыт Вексельбаумом в 1887 г. Выделен из спинномозговой жидкости больного менингитом.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ МЕНИНГОКОККАМИ

1. Цереброспинальный эпидемический менингит (гнойное воспаление мозговых оболочек).

2. Как гноеродные микробы, менингококки могут вызывать воспалительные и гнойные процессы в разных органах.

Ворота инфекции. Менингококк проникает в организм воздушно-капельным путем и локализуется в слизистой оболочке носоглотки, вызывая местное воспаление — ринофарингит. В мозговую оболочку менингококк попадает гематогенным путем (через кровь). Поэтому менингококк может быть обнаружен в крови.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Менингококки — диплококки, состоящие из двух бобовидных кокков, лежащих вогнутыми сторонами друг к другу (см. рис. 1—I—4).

Размер каждого кокка 1,2—1,5×0,6—0,8 мк. Менингококки неподвижны, не имеют спор, иногда образуют нежную капсулу. Часто располагаются внутри лейкоцитов, но встречаются и вне клеток. Грамотрицательны.

Расположение менингококков попарное, иногда тетрадами (по четыре); для этих микробов характерен полиморфизм — они изменяют величину, форму и даже отношение к окраске по Граму. Наряду с грамотрицательными встречаются грамположительные бактерии.

Менингококки образуют эндотоксин; в последнее время выделен и экзотоксин, который еще мало изучен.

Культуральные свойства

Менингококки — аэробы, растут при температуре 37° и pH среды 7,4—7,6, размножаются только на средах, содержащих нативный белок (сыворотку, кровь). При культивировании их на плотных питательных средах количество агар-агара не должно превышать 2%. Среды должны быть свежеприготовленными и влажными (см. стр. 154).

На агаре с сывороткой колонии менингококков небольшие (2—3 мм в диаметре), нежные, прозрачные, бесцветные, с матовым центром.

На бульоне с сывороткой менингококк образует легкую муть и небольшой осадок на дне. Через 3—4 дня на поверхности бульона образуется нежная пленка.

Биохимические свойства

Ферментативные свойства менингококков выражены слабо. Молоко менингококки не створаживают, желатин не разжижают, углеводы (только глюкозу и мальтозу) расщепляют с образованием кислоты.

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕНИНГОКОККОВ

Специфичность менингококка связана с составом полисахаридной фракции. Состав полисахаридной фракции различен, и на этом основании менингококки делят на несколько типов, обозначаемых большими латинскими буквами A, B, C, D. В настоящее время описано 7 типов. Однако чаще всего встречаются первые два типа A и B (типы C и D относят к параменингококкам).

Контрольные вопросы

1. Какие заболевания вызывают менингококки?
2. Назовите основные ворота менингококковой инфекции.
3. Какой токсин образуют менингококки?
4. Состав какой фракции позволяет разделить менингококки на типы, сколько описано типов менингококков и какие из них чаще встречаются?

Задание. Получите у преподавателя окрашенный мазок менингококков. Изучите его под микроскопом. Зарисуйте цветными карандашами и покажите преподавателю.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

При температуре 60° менингококки погибают через 10 минут, при температуре 70° — через 2—3 минуты. При культивировании менингококков и термостате (при 37°) не должно быть колебаний температуры, так как эти микробы легко разрушаются, при разрушении выделяется эндотоксин. Менингококк очень быстро погибает при охлаждении и высыхании.

Действие дезинфицирующих веществ: 1% раствор фенола и разведенная (1 : 1000) сулема вызывают гибель менингококка через минуту.

Контрольные вопросы

1. На каких средах выращивают менингококки?
2. Какие условия необходимы для их роста?
3. Какова биохимическая активность менингококков?
4. Какова устойчивость менингококков к физическим и химическим факторам?

Задание. Заполните форму № 18, указав характер роста, биохимические свойства и устойчивость менингококков к физическим и химическим факторам.

Форма № 18

Рост на средах		Биохимические свойства						Устойчивость к физическим и химическим факторам				
								температура		высыхание	1% фенол	раствор сулемы (1 : 1000)
агар с сывороткой	бульон с сывороткой	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	молоко	желатин	70°	5° и ниже			

Основным материалом для исследования являются:

1) спинномозговая жидкость,
2) отделяемое слизистой оболочки носоглотки,
3) кровь.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выявление менингококков при заболевании (диагностическое исследование), выделение менингококков у бактерионосителей (профилактическое или по эпидемическим показаниям).

Характер материала	Способ сбора материала
Спинномозговая жидкость (ликвор)	Из спинномозгового канала, соблюдая правила асептики, берут стерильным шприцем 2—5 мл спинномозговой жидкости. Собранный материал сразу переносят над пламенем горелки в центрифужную пробирку и доставляют в лабораторию. От момента сбора материала до посева его не должно пройти более 2—3 часов. При хранении и во время транспортировки собранный материал надо предохранять от охлаждения и высыхания.*

* Примечание. Материал следует брать до начала лечения

Характер материала	Способ сбора материала
Отделяемое слизистой оболочки носоглотки	Для сбора материала используют стерильный ватный тампон, укрепленный на проволоке (лучше алюминиевой). Перед сбором материала тампон изгибают о край пробирки под углом 135° на расстоянии 3—4 см от того конца, на который накручена вата. Затем стерильным шпателем, находящимся в левой руке, прижимают корень языка, а правой рукой вводят тампон концом вверх под мягкое небо в носоглотку и легкими движениями собирают отделяемое — слизь. Извлекать тампон на-

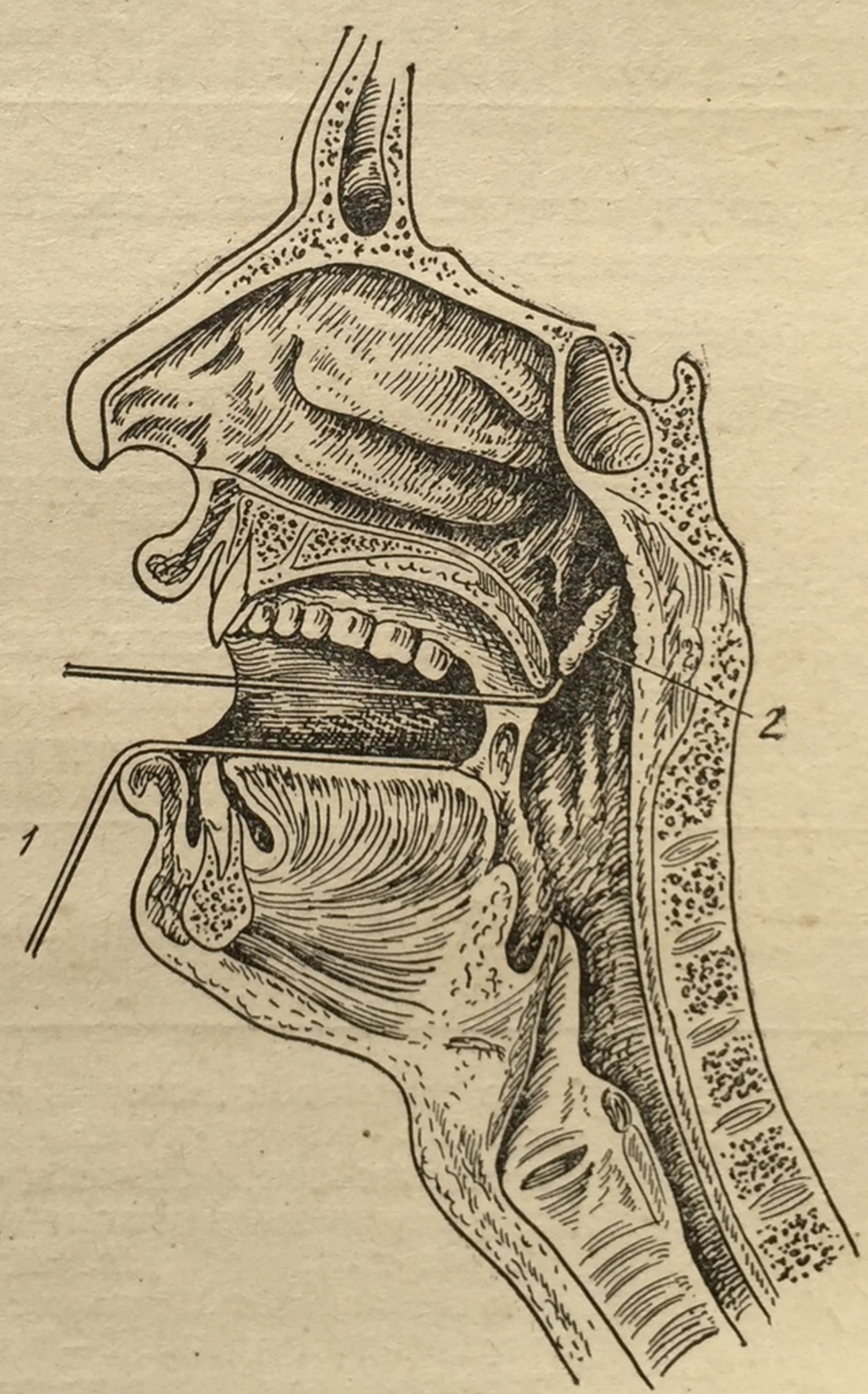


Рис. 25. Взятие слизи из носоглотки для исследования на менингококки.
1 — шпатель; *2* — тампон для взятия материала.

Характеристика материала	Методика исследования
	до очень осторожно, чтобы не задеть язык, щеку и не коснуться зубов (рис. 25).* Посев взятого материала производят сразу на чашку Петри с агаром с сывороткой (см. стр. 56); при этом материал втирают в среду, поворачивая тампон. Так как слизь носоглотки содержит разнообразную флору, которая может подавить рост менингококков, то к среде с сывороткой прибавляют антибиотик ристомицин (см. стр. 154) в концентрации, которая подавляет рост грамположительных кокков, а на менингококки не действует.
Кровь	Засеянные чашки доставляют в лабораторию, охраняя их от охлаждения и высыхания. 5—10 мл крови берут стерильно из локтевой вены и помещают во флакон с бульоном и 0,1% глюкозы. Посев производят в соотношении 1:10.

Примечание. Материал берут натощак или не ранее чем через 3—4 часа после последней еды.

Контрольные вопросы

1. Какой материал служит для выявления менингококков?
2. Что прибавляют к собранному материалу для подавления роста грамположительных кокков?
3. Как следует транспортировать исследуемый материал?

Задание. Подготовьте тампон, изогните его под углом 135° и возьмите друг у друга слизь из носоглотки (см. рис. 25).

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основные методы исследования

1. Микроскопический.
2. Микробиологический.
3. Дополнительный метод исследования.

Характеристика материала	Методика исследования
	Первый день исследования
Ликвор (спинномозговая жидкость)	Доставленную в лабораторию спинномозговую жидкость центрифугируют. Одну каплю осадка засевают на агар с сывороткой в чашки Петри (см. стр. 56). Из осадка готовят мазок, высушивают, фиксируют, окрашивают водным раствором фуксина или метиленовым синим и микроскопируют. Наличие бобовидных диплококков дает право на предварительный ответ. Осадок ликвора в центрифужных пробирках заливают 5 мл полужидкого агара и помещают в термостат для накопления микробов.
Кровь	Засеянную во флакон кровь помещают в термостат при температуре 37°.
Слизь из носоглотки	Доставленные в лабораторию чашки с посеянной на них слизью ставят в термостат.
	Второй день исследования
Ликвор	Вынимают из термостата чашки Петри, просматривают их. При наличии подозрительных колоний (см. стр. 145) 2—3 колонии выделяют на скошенный агар с сывороткой в пробирках (для получения чистой культуры).
Кровь	Производят посев на агар с сывороткой в чашках Петри.
Слизь из носоглотки	Вынимают из термостата чашки с посевом слизи, подозрительные колонии (2—3) выделяют на скошенный агар для получения чистой культуры. Посевы ставят в термостат.
	Третий день исследования
Ликвор	Вынимают из термостата посевы. Просматривают их. На поверхности агара с сывороткой менингококки дают нежный влажный налет серовато-белого цвета. Для определения чистоты выделенной культуры делают мазки, окрашивают их метиленовым синим или по Граму и микроскопируют. При наличии бобовидных диплококков проводят дифференциацию выделенной культуры от сходных с ними непатогенных нейссерий. Для этого производят посев на: 1) агар и помещают в термостат при 37°,

Характеристика материала	Методика исследования
	2) на агар с сывороткой и оставляют при температуре 22°, 3) на агар с сывороткой и ставят в термостат при температуре 37°, 4) на среды Гисса с 0,25% сыворотки (лактоза, глюкоза, сахароза и мальтоза).
Кровь	Вынимают чашки из термостата. При отсутствии на них роста флакон с посевом крови продолжают инкубировать (содержать в термостате) в течение недели с повторными, через каждые 2 дня, пересевами на агар с сывороткой в чашках. При наличии на чашках подозрительных колоний выделяют 2—3 колонии на скошенный агар с сывороткой для получения чистой культуры. Дальнейшее исследование ведут так же, как указано для ликвора.
Слизь из носоглотки	Вынимают из термостата посевы в пробирках. Проверяют чистоту культуры, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных бобовидных диплококков исследование ведут так же, как исследование ликвора.
	Четвертый день исследования Учет результатов (см. табл. 22).

Таблица 22

Дифференциация менингококков от других нейссерий

Характер культуры	Температура 37°		Температура 22°	Среды Гисса			
	посев на агар с сывороткой	посев на агар	посев на агар с сывороткой	лактоза	глюкоза	сахароза	мальтоза
Менингококки	Рост	—	—	—	К	—	К
Нейссерии непатогенные	»	Рост	Рост	—	—	—	—

Условные обозначения: К — кислота; — отсутствие роста.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Определение типа менингококка
Культура менингококка	После того как точно установлено, что выделена культура менингококка, проводят серологическое типирование. Для типирования используют агглютинирующие сыворотки (полученные в лаборатории иммунизацией кроликов). Вначале ставят ориентировочную реакцию агглютинации на предметном стекле с сывороткой, разведенной в 10 раз. Для этого на стекло наносят 4 капли: первая капля — сыворотка типа А (разведение 1:10), вторая капля — сыворотка типа В (разведение 1:10), третья — С (разведение 1:10), четвертая — физиологический раствор (контроль). К каждой капле прибавляют одну петлю выделенной культуры. Наличие агглютинации в одной из капель определяет тип выделенной культуры. Окончательное определение серологического типа производят в развернутой реакции агглютинации или реакции Нобля. **Постановка реакции Нобля.** Сыворотку, полученную из крови больного, разводят в соотношении 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64. По 0,1 мл каждого разведения вносят в агглютинационные пробирки. В последнюю пробирку вносят 0,1 мл физиологического раствора для контроля (табл. 23). Для приготовления микробной взвеси производят смыв суточной культуры, выращенной на скошенном агаре с сывороткой. Взвесь готовят таким образом, чтобы в 1 мл содержался 1 млрд. микробных клеток. В каждую пробирку (включая контрольную) добавляют по 0,1 мл микробной взвеси. Все пробирки тщательно встряхивают в течение 15 минут, лучше в шюттель-аппарате. Затем во все пробирки наливают по 0,8 мл физиологического раствора, после чего учитывают результат реакции. Положительной считается реакция, если агглютинацию отмечают в разведении 1:16 и выше.

Таблица 23

Схема постановки реакции агглютинации по Ноблю

	Разведения сыворотки больного						Контроль — физиологический раствор
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
Сыворотка больного	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Взвесь менингококков	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	++++	++++	++++	++++	+++	++	—

Контрольные вопросы

1. Назовите способы получения материала для выделения менингококков.
2. Что следует делать с полученной спинномозговой жидкостью до посева?
3 Что дает право дать предварительный ответ? Обоснуйте ответ.
4. От каких микроорганизмов необходимо дифференцировать менингококки?
5. Какие исследования производят для дифференциации менингококков от других нейссерий?
6. Какую реакцию ставят для определения серологического типа менингококков?

Задание. Заполните форму № 19, указав этапы микробиологического исследования по дням.

Форма № 19

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

Агар с сывороткой (стр. 56).

Среда с ристомицином.

К 80 мл расплавленного и остуженного до температуры 50° 2% агара добавляют 20 мл лошадиной или бычьей сыворотки; 2,5 мл 2% раствора мальтозы, простерилизованной текучим паром, 1,5 мл 2% раствора водного голубого красителя и 0,75 мл раствора ристомицина, содержащего 20 000 единиц в 1 мл. Растворы готовят на стерильной воде и сохраняют в холодильнике. После перемешивания среду разливают в чашки Петри.

Глава 11. ГОНОКОККИ

Семейство нейссериацее, род Neisseria. Гонококки обнаружены Нейссером в 1879 г. Гонококки паразитируют только в организме человека.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГОНОКОККАМИ

1. Гонорея — заболевание мочеполовых путей.
2. Бленнорея — заболевание слизистой оболочки глаз.
3. Кроме того, гонококки, как представители гноеродных бактерий, могут быть причиной воспалительно-гнойных процессов разных органов.

Основными воротами инфекции являются слизистые оболочки мочеполовых путей и глаз.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Гонококки представляют собой диплококки, состоящие из двух бобовидных кокков, лежащих вогнутыми сторонами внутрь (по форме напоминают кофейные зерна). Размер гонококков 1,2—1,3×0,7—0,8 мк, они неподвижны, спор не образуют, капсул не имеют, однако в свежевыделенном материале вокруг гонококка можно обнаружить капсулоподобное слизистое вещество; грамотрицательны (см. рис. 1—I—5).

Образуют эндотоксин. По антигенной структуре гонококки можно разделить на ряд типов, но практического значения типирование гонококков не имеет.

Контрольные вопросы

1. Какие заболевания вызывают гонококки?
2. Назовите основные ворота гонококковой инфекции.
3. Опишите морфологию гонококков и их отношение к окраске по Граму.
4. Какой токсин образуют гонококки?

Задание. Получите у преподавателя окрашенный мазок гонококков. Изучите его под микроскопом. Зарисуйте в тетрадь цветными карандашами и покажите преподавателю.

Обратите внимание на расположение гонококков в лейкоцитах!

Культуральные свойства

Гонококки — аэробы; очень требовательны к питательным средам и плохо растут на них. Для выделения гонококка исследуемый материал засевают на агар с сывороткой или среду Бейля (см. стр. 160). Посев нужно производить немедленно после взятия материала на свежеприготовленные среды. Гонококки образуют мелкие колонии (1—2 мм), прозрачные, голубоватые, блестящие, с ровными краями (напоминают капельки росы). При старении колонии мутнеют и приобретают серый цвет. При скудном росте через 24 часа посевы оставляют в термостате на вторые сутки.

Биохимические свойства

На желатине, молоке, картофеле и других средах гонококки не растут. Из углеводов расщепляют глюкозу (не всегда) с образованием кислоты.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Во внешней среде гонококки малоустойчивы.

При температуре 40° снижается жизнеспособность гонококка, а при температуре 50° гонококки погибают.

Низкие температуры и высыхание быстро губят гонококка.

Дезинфицирующие растворы: 1% раствор фенола (карболовая кислота), сулема в разведении 1 : 1000— убивают гонококка в течение нескольких минут.

Гонококки особенно чувствительны к азотнокислому серебру. От действия 1% раствора азотнокислого серебра они очень быстро погибают. Это действие используют для предупреждения заболевания глаз (бленнорея) у новорожденных. С профилактической целью детям вводят в конъюнктивальный мешок несколько капель 2% раствора азотнокислого серебра.

Контрольные вопросы

1. На каких средах растет гонококк и какие условия необходимы для его роста?
2. Как гонококки относятся к свободному кислороду воздуха?
3. Какова биохимическая активность гонококков?
4. Какова устойчивость гонококков к физическим и химическим факторам?
5. К какому химическому препарату гонококки особенно чувствительны?

Задание. Заполните форму № 20, указав характер роста гонококков, биохимические свойства и отношение к физическим и химическим факторам.

Форма № 20

Рост на средах		Биохимические свойства						Устойчивость к физическим и химическим факторам					
								температура					
агар с сывороткой	бульон с сывороткой	лактоза	глюкоза	маннит	мальтоза	желатин	молоко	50°	5° и ниже	высыхание	сулема 1:1000	1% раствор фенола	1% раствор азотнокислого серебра

Материалом для исследования являются:

1) отделяемое слизистой оболочки уретры у мужчин,
2) отделяемое слизистой оболочки влагалища и шейки матки у женщин,
3) гнойные выделения из глаз.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выявление гонококка

Материал для исследования	Способ сбора материала
Отделяемое слизистой оболочки уретры у мужчин	Материал собирают стерильной петлей, ватным тампоном или ложечкой.*
Отделяемое слизистой оболочки влагалища у женщин	Материал собирают стерильной петлей, ватным тампоном или ложечкой.**
Гнойное выделение из глаз	Берут стерильным тампоном, предварительно увлажненным в физиологическом растворе.
Кровь	Берут стерильно из локтевой вены в количестве 5—6 мл.

Примечание.* Материал следует брать не раньше чем через 2 часа после последнего мочеиспускания.

** Материал следует брать не раньше чем через 2 часа после последнего мочеиспускания или спринцевания.

Основные методы исследования

1. Микроскопический (приготовление мазка, окраска по Граму, изучение под микроскопом).
2. Микробиологический (посев, выделение чистой культуры и изучение ее).
3. Серологический.

Примечание. Гонорея может протекать в острой и хронической форме (при острых формах заболевания основным методом исследования является микроскопия).

Контрольные вопросы

1. Какой материал служит для выявления гонококков?
2. Назовите способы получения материала для исследования.
3. Через сколько времени после мочеиспускания (или спринцевания у женщин) можно брать материал для исследования? Обоснуйте свой ответ.

Задание. Заполните форму № 21, указав способы сбора материала,

Стерильным тампоном	Стерильным увлажненным тампоном	Стерильной ложечкой	Стерильной петлей	Стерильным шприцем

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Период заболевания	Методика исследования
	Первый день исследования
При исследовании в остром периоде заболевания	Из собранного материала делают мазки на двух предметных стеклах, растирая полученный материал на $^1/_3$ стекла. Сделанные мазки высушивают, фиксируют и окрашивают по Граму или метиленовым синим. При микроскопии обращают внимание на количество лейкоцитов с внутриклеточным расположением грамотрицательных бобовидных диплококков, что свидетельствует об острой гонококковой инфекции.
При исследовании хронической формы заболевания	В тех случаях, когда при помощи микроскопии гонококк выявить не удается, что бывает чаще всего при хронических формах заболевания, производят посев исследуемого материала на питательные среды, на МПА с 30% сывороткой, на МПБ с 30% сывороткой или на среду Бейля (см стр. 160). Посевы ставят в термостат при температуре 37°.
	Второй день исследования
	Вынимают посевы из термостата и просматривают их. При наличии нежных, прозрачных колоний делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении в мазках грамотрицательных бобовидных диплококков колонии пересевают на скошенный агар с сывороткой, который должен быть свежеприготовленным, чтобы в нем содержалось достаточное количество конденсата. Для увлажнения в термостат помещают банку с водой.

Продолжение

Период заболевания	Методика исследования
	Третий день исследования Вынимают посевы из термостата. 1. Делают мазки со скошенного агара, окрашивают по Граму и микроскопируют.* 2. Засевают на среды Гисса (лактозу, глюкозу, маннит и мальтозу). Сахара должны содержать 30% сыворотки крови. Засеянные пробирки помещают в термостат. **Четвертый день исследования** Вынимают пробирки из термостата, при отсутствии роста на них оставляют в термостате еще на 1—2 дня. При наличии роста учитывают результаты (см. табл. 24).

Таблица 24

Дифференциация гонококка от других нейссерий

Вид микроба	Расщепление сахаров			
	лактоза	глюкоза	маннит	мальтоза
Гонококк	—	±	—	—
Менингококк	—	+	—	+
Катаральный микрококк	—	—	—	—

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Серологический метод исследования
	Третья неделя заболевания
Сыворотка крови больного	Ставят реакцию связывания комплемента с сывороткой больных (см. стр. 87). В качестве антигена используют убитую культуру гонококка.**

* Примечание. При окраске по Граму вместо фуксина Пфейффера лучше использовать раствор кейтральрота.

** Примечание. Реакцию связывания комплемента обычно ставят в хронических и сомнительных случаях.

Контрольные вопросы

1. Какой метод исследования является основным при острой форме гонореи?
2. Какую серологическую реакцию ставят при хронической форме гонореи?
3. От каких микроорганизмов надо дифференцировать гонококки?

Задание. Заполните форму № 22, указав этапы микробиологического исследования по дням.

Форма № 22

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Агар с сывороткой (стр. 56).
Бульон с сывороткой (стр. 56).
Среда Бейля.

К 30 г хорошо промытого агара добавляют 1 л дистиллированной воды на несколько часов (8—10). Затем автоклавируют 20 минут при температуре 120° при давлении 1 атм, фильтруют через марлю, охлаждают до температуры 56° и прибавляют 250 г мелко нарезанного мяса и 250 г нарезанного бычьего сердца. Полученную смесь нагревают при температуре 80° в течение 30 минут, процеживают через марлю, прибавляют 1% пептон, 0,5% хлористого натра и устанавливают pH 7,4—7,5 (подщелачивают едким натром).

Полученную среду переливают в фарфоровые стаканы и оставляют до следующего дня. На следующий день с застывшего агара срезают верхнюю часть и стерилизуют ее текучим паром 3 дня подряд при 100° (по 15 минут каждый день).

Перед посевом добавляют 25—30% стерильной сыворотки крови. Используют при микробиологической диагностике хронической формы гонореи.

ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Глава 12. ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ СЕРОТИПЫ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Семейство кишечных, род Escherichia. Эти микроорганизмы были выделены из кишечника человека. В дальнейшем эшерихии коли были обнаружены также у других млекопитающих, птиц, рыб, амфибий, рептилий и даже у насекомых.

Естественным местом обитания кишечной палочки у человека и животных является толстый кишечник. Выделяясь в большом количестве с испражнениями, микробы попадают в почву, воду и другие объекты внешней среды.

В условиях естественного обитания эшерихии способствуют пищеварению, выделяя ферменты, расщепляющие клетчатку. Они синтезируют некоторые витамины (например, витамин группы В). Эти бактерии проявляют антагонистическое действие в отношении патогенных микроорганизмов, таких, как возбудители дизентерии, токсикоинфекций и др.

При снижении резистентности организма (голодание, переутомление) или при травмах эшерихии могут проникнуть эндогенным путем в другие органы или отделы кишечного тракта и быть причиной тяжелых патологических процессов. Так, например, при попадании кишечной палочки в желчные пути возникает холецистит, при попадании этих микроорганизмов в мочевые пути — пиелит и цистит, при проникновении их в кровь — сепсис. Таким образом, эшерихии коли можно отнести к условно патогенным микроорганизмам.

Среди E. coli существуют разновидности, обладающие свойствами патогенных организмов. Они получили название энтеропатогенных и отличаются от других представителей этого рода составом антигенного комплекса.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫМИ КИШЕЧНЫМИ ПАЛОЧКАМИ

Колиэнтериты. Попадая в организм экзогенным путем, энтеропатогенные палочки способны проникать и размножаться в тонком кишечнике и вызывать клинически вы-

раженные формы кишечной инфекции. Эти формы инфекции — колиэнтериты — встречаются в основном у детей раннего возраста и характеризуются склонностью к эпидемическому распространению. Клиническая картина колиэнтеритов очень сходна с дизентерией и токсикоинфекциями. Путь проникновения (ворота инфекции) — алиментарный (через рот).

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

По своим морфологическим свойствам и биохимической активности энтеропатогенные кишечные (ЭПКП) палочки не отличаются от других типов эшерихий. Это небольшие (2,5—3×0,5—0,8 мк) полиморфные палочки с закругленными концами (рис. 1—II—4). Грамотрицательны, подвижны, но встречаются и неподвижные штаммы. Спор не образуют, некоторые разновидности обладают капсулой. Образуют эндотоксины, эшерихии отдельных серотипов образуют также экзотоксин.

Контрольные вопросы

1. Почему кишечные палочки называются эшерихиями?
2. Какой орган является местом естественного обитания эшерихий?
3. В чем роль эшерихий?
4. В каких случаях эшерихии могут быть причиной заболевания человека?
5. Как называются эшерихии, обладающие патогенными свойствами?
6. Какие заболевания вызывают энтеропатогенные кишечные палочки?
7. Для какой возрастной группы характерны заболевания колиэнтеритами?
8. Опишите морфологию энтеропатогенных кишечных палочек и их отношение к окраске по Граму?

Задание. Возьмите у преподавателя пробирку с культурой энтеропатогенной кишечной палочки, сделайте мазок, зафиксируйте, окрасьте по Граму, изучите под микроскопом, зарисуйте цветными карандашами и покажите преподавателю.

Культуральные свойства

Энтеропатогенные кишечные палочки являются факультативными аэробами, растут при температуре 37° и pH 7,2—7,4 на обычных питательных средах: МПА, МПБ и дифференциально-диагностических средах Эндо, Левина и др.

На среде Эндо они образуют розовые или малиново-красные колонии с металлическим блеском или без него, на среде Левина — колонии темно-фиолетового цвета, на бульоне — равномерное помутнение. В качестве элективной среды чаще всего используют среду Эндо.

Биохимические свойства

Энтеропатогенные кишечные палочки расщепляют углеводы — глюкозу, маннит, мальтозу с образованием кислоты и газа, а питательные субстраты, содержащие пептон, — с образованием индола и сероводорода. Желатин не разжижают.

По своим культуральным свойствам и биохимической активности энтеропатогенные кишечные палочки сходны с другими разновидностями E. coli. Отличаются они только антигенной структурой.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Для идентификации энтеропатогенных кишечных палочек необходимо определение антигенов трех видов — О, К и Н; О — соматический антиген (термостабильный); К — оболочечный, капсульный антиген, названный поверхностным, так как расположен в поверхностном слое клеточной стенки; К-антигены неоднородны (L, M, B, Vi, A), могут быть термолабильными (L, Vi и B) и термостабильными (A и M); Н-антиген жгутиковый (термолабильный), отсутствует у неподвижных штаммов (рис. 26).

По О-антигену энтеропатогенные кишечные палочки разделяют на 149 серологических О-групп. Однако возбудителями колиэнтеритов чаще всего бывают представители следующих групп: О111; О55; О26; О86; О126; О127; О20 (145) и др.

Наиболее изученным компонентом К-антигена является В-антиген. Серологическую разновидность внутри О-группы долгое время определяли по сочетанию О- и В-антигенов: например О55 : В5. В настоящее время поверхностные К-антигены обозначают сплошной нумерацией: К1, К2... К58 и т. д., но в скобках указывают прежние обозначения, например О55 : К59(В5), О26 : К60(В6), О20 : К84(В) и т. д.

Серологические типы энтеропатогенной кишечной палочки устанавливают по сочетанию О-, К- и Н-антиге-

нов, например O20 : K84(B) : H34 или O20 : K84(B) : H9 и т. п.

Таким образом, разное сочетание О-, К- и Н-антигенов определяет серологическую специфичность каждого типа. Соотношение антигенов постоянно для каждого штамма энтеропатогенной кишечной палочки.

В диагностической практике большое значение имеет тот факт, что К-антигены обладают свойством препятствовать реакции агглютинации живых культур О-сыворотками. Это свойство получило название О-инагглютинабельности. Прогревание живых бактерий в течение часа при температуре 100° на водяной бане разрушает К-антиген. Поэтому гретая культура дает отчетливо выраженную агглютинацию с О-сыворотками.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Энтеропатогенные палочки довольно устойчивы к воздействию различных факторов: при температуре 55° они погибают в течение часа, при температуре 65° — за 15 минут. В почве и воде сохраняются длительное время (2—3 месяца). Обычно растворы дезинфицирующих веществ (3% хлорамин, раствор сулемы 1 : 1000) убивают их в течение 20—30 минут. Особо чувствительны энтеропатогенные кишечные палочки к бриллиантовому зеленому.

Контрольные вопросы

1. На каких средах выращивают энтеропатогенные кишечные палочки?
2. Какая среда является элективной для ЭПКП?
3. Охарактеризуйте антигенную структуру энтеропатогенной кишечной палочки.
4. Какие антигены имеют наибольшее значение в бактериологической диагностике ЭПКП?
5. Какой антиген является термостабильным и какой термолабильным?
6. Какой антиген энтеропатогенных кишечных палочек определяет серологическую группу эшерихий?
7. Как определяют серологическую разновидность внутри О-группы эшерихий?
8. Как устанавливают серологические типы эшерихий?
9. Какой антиген препятствует реакции агглютинации живых культур с О-сыворотками и что нужно сделать, чтобы выявить О-агглютинацию?

Задание. Заполните форму № 23, указав характер роста, биохимические свойства и отношение ЭПКП к физическим и химическим факторам.

Форма № 23

Рост на средах			Биохимические свойства							Устойчивость к физическим и химическим факторам			
Эндо	Левина	бульон	лактоза	сахароза	маннит	мальтоза	сероводород	индол	желатин	60°	высушивание	3% фенол	сулема 1:1000

Материалом для исследования являются:

1) испражнения,

2) рвотные массы.

При необходимости исследуют отделяемое из носа и зева, гной из уха, кровь, мочу, кусочки органов трупа.

При возникновении очага заболеваний колиэнтеритом исследуют (по эпидемиологическим показаниям) пищевые продукты, смывы с рук обслуживающего персонала, смывы с игрушек и других предметов.

Решающим в дифференциации колиэнтеритов от других кишечных инфекций является микробиологический метод исследования.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение и идентификация энтеропатогенных кишечных палочек.

Материал для исследования	Способ сбора материала
Испражнения	3—5 г испражнений помещают в пробирку с физиологическим раствором или 30% глицериновой смесью (30 частей глицерина и 70 частей физиологического раствора). Целесообразно брать последние порции кала, так как при колиэнтеритах поражается тонкий кишечник. У грудных детей материал для исследования берут с пеленок.*
Рвотные массы	3—5 г собирают в стерильную посуду и эмульгируют (размешивают) в физиологическом растворе.

* Примечание. Чем раньше от начала заболевания исследуют испражнения, тем вероятнее возможность выделения возбудителя.

Контрольные вопросы

1. Какой материал исследуют?
2. Какие порции испражнений следует брать для исследования — первые или последние? Обоснуйте свой ответ.
3. Какое количество материала берут для исследования и в чем его эмульгируют?

Основной метод исследования — бактериологический (выделение чистой культуры и изучение ее свойств)

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Методика исследования
Испражнения, рвотные массы	Первый день исследования Собранный материал засевают на среду Эндо или Левина (см. стр. 170). Посев производят следующим образом: немного материала, взятого стеклянной пипеткой или стеклянной трубкой, эмульгируют в физиологическом растворе или глицериновой смеси и пастеровской пипеткой или петлей наносят на чашку со средой. Затем стерильным стеклянным шпателем растирают нанесенную взвесь на небольшом участке поверхности среды, после чего, не прожигая шпатель, растирают им оставшийся материал по всей поверхности чашки. Такой метод позволяет получить изолированные колонии. Посев желательно производить на две или три чашки, набирая для каждой чашки материал заново. Чашки с посевом ставят в термостат. Второй день исследования Вынимают из термостата засеянные накануне чашки и просматривают их в падающем или проходящем свете. При наличии малиново-красных колоний на среде Эндо или фиолетовых на среде Левина ставят пробную реакцию агглютинации для дифференциации энтеропатогенных кишечных палочек от других разновидностей эшерихий коли. Для постановки пробной реакции агглютинации отбирают не менее 10 изолированных колоний, отмечая или нумеруя их на обратной стороне чашки; часть каждой намеченной колонии снимают петлей и агглютинируют в капле поливалентной (комплексной) сыворотки. Испытывают только часть колонии, чтобы в случае положительной реакции агглютинации можно было из оставшейся части выделить чистую культуру.

Характер материала	Методика исследования
	Типовые и поливалентные коли-сыворотки изготовляют в производственных условиях. Поливалентные (комплексные) коли-сыворотки содержат антитела к нескольким О- и К-антигенам, с их помощью ориентировочно определяют принадлежность выделенной культуры к энтеропатогенным типам кишечной палочки (например, сыворотка к типам О26, О55, О111, О20 и т. п.). Сыворотки разводят согласно указанию на этикетке. В лаборатории можно приготовить смесь типовых коли-сывороток, соединяя не более 5 сывороток так, чтобы разведение каждой было не выше 1:10. **Постановка пробной реакции агглютинации** На одно или два хорошо обезжиренных предметных стекла наносят 10 капель поливалентной (комплексной) сыворотки, в каждую каплю вносят часть намеченной колонии и эмульгируют ее. Колонии, давшие положительную реакцию агглютинации, отсевают в пробирки со скошенным агаром и ставят в термостат на 18—20 часов. Если ни одна из 10 колоний не дала агглютинации, дают отрицательный ответ. Третий день исследования Вынимают из термостата посевы и просматривают их. На мясо-пептонном агаре энтеропатогенные палочки образуют обычно влажный, блестящий, сероватый налет, реже — мутный. Выросшую на скошенном агаре культуру повторно проверяют в реакции агглютинации на предметном стекле с поливалентными (комплексными) ОВ-сыворотками. Если выделенная культура дает положительную реакцию агглютинации с комплексной сывороткой, то ее агглютинируют раздельно с каждой типовой сывороткой, входящей в поливалентную, в разведении 1:5—1:10. Агглютинация с живой культурой имеет ориентировочное значение. Далее необходимо подтвердить принадлежность выделенного штамма к роду эшерихий биохимическими тестами. Для этого производят посев культуры на полужидкие среды Гисса (с лактозой, глюкозой, маннитом, сахарозой и мальтозой), а также на бульон с «индикаторными» бумажками для определения образования индо-

Характер материала	Методика исследования
	ла и сероводорода. (Одна бумажка при наличии индола краснеет, другая при наличии сероводорода чернеет.) При ферментации сахаров реакция среды становится кислой и цвет индикатора изменяется. Если, помимо кислоты, образуется газ, в среде появляются пузырьки. Одновременно определяют подвижность бактерий: подвижные бактерии дают диффузный рост и помутнение всей среды, неподвижные бактерии растут по уколу. Для окончательной идентификации (определения) выделенной культуры ставят развернутую реакцию агглютинации с живой и гретой культурами: с живой культурой — для определения К-антигена, с гретой — для определения О-антигена. Для постановки развернутой реакции агглютинации антиген готовят следующим образом: 3—5 мл физиологического раствора смывают культуру со скошенного агара. Полученную суспензию разливают в обе пробирки, одну из них прогревают на водяной бане при температуре 100° в течение часа. Развернутую реакцию агглютинации ставят в двух рядах пробирок. Сыворотку в обоих рядах разводят в соотношении от 1:50 или 1:100 до титра, указанного на этикетке. В первый ряд пробирок добавляют по 2 капли живой культуры, во второй — по 2 капли гретой культуры. Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 18—20 часов. Четвертый день исследования Производят учет изменений углеводов в средах Гисса, образование индола и сероводорода. Большинство представителей кишечных палочек ферментируют углеводы с образованием кислоты и газа, расщепляют белковый субстрат до индола и сероводорода (табл. 25). Учет пробирочной реакции агглютинации производят с помощью лупы или агглютиноскопа. В реакции агглютинации с живой культурой образуется крупнохлопчатый агглютинат, с убитой — мелкозернистый агглютинат. Реакцию считают положительной, если агглютинация гретой культуры идет до титра сыворотки или в разведении не ниже половины титра, а живая культура агглютинируется в разведении сыворотки не ниже 1:200. Результаты реакции агглютинации приведены в табл. 26.

Таблица 25

Ферментативные свойства энтеропатогенных типов кишечных палочек

Характер культуры	Углеводы					Образование		
	лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	индола	H_2S	молоко
Энтеропатогенная кишечная палочка	КГ	КГ	КГ	КГ	КГ	+	+	Створаживает

Примечание: КГ — образование кислоты и газа.

Таблица 26

Различные варианты результатов реакции агглютинации

Культура	Разведение сыворотки							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	Результат реакции
Живая Гретая	++++ ++++	++++ ++++	++ ++++	– ++++	– ++++	– +++	– –	Положительный
Живая Гретая	++++ ++++	++++ ++++	++++ ++++	+++ +++	+++ ++	+ +	– –	Сомнительный
Живая Гретая	++++ –	++++ –	++++ –	+++ –	++ –	– –	– –	Отрицательный

Первый вариант — гретая культура агглютинируется сывороткой в бо́льших разведениях, чем живая; реакция положительная.

Второй вариант — живая и гретая культуры дают агглютинацию в одинаковых титрах сыворотки; результат сомнительный. Такой результат может свидетельствовать об отсутствии в культуре К-антигена; агглютинация живой и гретой культуры вызвана наличием только О-антигена. В этих случаях необходима проверка — повторная постановка реакции.

Третий вариант — агглютинация живой культуры при отсутствии реакции гретой позволяет дать отрицательный ответ, так как свидетельствует об отсутствии О-антигена, специфического для данной группы.

Биологическая проба. Биологическую пробу используют для определения вирулентности энтеропатогенной кишечной палочки.

Проба ставится на белых мышах. При помощи зонда животным вводят per os 2 мл двухмиллиардной суточной культуры. У животных развивается острый энтерит, заканчивающийся гибелью.

Контрольные вопросы

1. При помощи какой сыворотки можно дифференцировать энтеропатогенные типы кишечной палочки от других разновидностей эшерихий коли?

2. В каком случае при пробной реакции агглютинации можно дать отрицательный ответ?

3. Для чего ставят развернутую реакцию агглютинации с живой и гретой культурами?

Задание. 1. Получите у преподавателя пробирку с исследуемым материалом и произведите посев на 2 чашки Петри со средой Эндо. 2. Возьмите у преподавателя чашки Петри с засеянной на среде Эндо культурой, отметьте 10 колоний и поставьте пробную реакцию агглютинации. Оставшуюся часть колонии, давшей агглютинацию, пересейте на скошенный МПА. 3. Возьмите у преподавателя культуру энтеропатогенной кишечной палочки на скошенном агаре, смойте физиологическим раствором. Часть смыва прогрейте на водяной бане при температуре 100°. Разведите сыворотку в двух рядах пробирок и поставьте реакцию агглютинации указанным выше способом. 4. Заполните форму № 24, указав этапы исследования по дням.

Форма № 24

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Дифференциальные среды Эндо и Левина служат для выращивания микробов кишечной группы. Выпускаются они медицинской промышленностью в виде сухого порошка. Согласно указаниям на этикетке, отвешивают определенное количество сухой среды, растворяют в соответствующем количестве воды, кипятят помешивая и разливают в стерильные чашки Петри.

В состав среды Эндо входят мясо-пептонный агар (pH 7,4), 2—3% спиртовой насыщенный основной фуксин, 10% водный раствор сернокислого натрия.

В состав среды Левина входят мясо-пептонный агар (pH 7,2—7,4), 2% водный раствор метиленового синего

(метиленовый синий 0,5%), 1,5% (2% раствор) желтого эозина, 2% лактозы, 0,2% двуосновного фосфорнокислого калия. Все растворы красок готовят на дистиллированной воде.

Глава 13. САЛЬМОНЕЛЛЫ

Семейство кишечных, род Salmonella.

Род Salmonella представляет обширную группу бактерий, в которую входят представители многих серологических типов — возбудителей заболеваний, называемых сальмонеллезами. В настоящее время описано около 2000 серотипов сальмонелл. Впервые представителя этой группы описал Salmon (Salmonella suipestifer), в честь которого и была названа вся группа.

Сальмонеллы делятся на моно- и бипатогенные. Первые вызывают в естественных условиях заболевания человека. К этой группе относятся возбудители брюшного тифа, паратифов А, В и С. Бипатогенные представители рода Salmonella вызывают заболевания человека и животных.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ САЛЬМОНЕЛЛАМИ

1. Брюшной тиф.
2. Паратиф А.
3. Паратиф В.
4. Токсикоинфекции.

Все сальмонеллы поражают лимфатический аппарат тонкого кишечника, вызывают бактериемию и явления общей интоксикации.

Клинически течение брюшного тифа, паратифов А и В сходно и без лабораторных данных различить их практически невозможно. Клиника токсикоинфекций отлична — они обычно более кратковременны и протекают остро.

Путь проникновения микроорганизмов — алиментарный.

ПАТОГЕНЕЗ БРЮШНОГО ТИФА И ПАРАТИФОВ

Заражение происходит через рот, затем бактерии проникают в просвет тонкого кишечника и в брыжеечные лимфатические узлы, сенсибилизируя их. Через лимфатиче-

ские узлы сальмонеллы попадают в кровь — стадия бактериемии. Кровью бактерии заносятся в паренхиматозные органы: печень, селезенку и др. К этому времени в крови уже накапливаются антитела, что влечет за собой освобождение крови и паренхиматозных органов от бактерий. Однако в желчном пузыре они могут длительно сохраняться, так как желчь является благоприятной средой для развития сальмонелл. Из желчного пузыря через желчные пути бактерии вновь попадают в тонкий кишечник, где вызывают воспаление и некроз сенсибилизированных солитарных фолликулов и пейеровых бляшек. Некротические массы, в которых находятся бактерии, отторгаются, попадают в просвет кишечника и выделяются с испражнениями. На месте некротических масс образуются язвы (рис. 27), которые в период выздоровления (реконвалесценции) заживают.

Контрольные вопросы

1. Какие сальмонеллы являются монопатогенными и какие бипатогенными?
2. Какие заболевания вызывают сальмонеллы?

Задание. Изучите патогенез брюшного тифа и паратифов. Расскажите преподавателю, как вы усвоили схему циркуляции сальмонелл в организме человека, и зарисуйте в тетрадь.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Морфологически возбудители брюшного тифа, паратифов и токсикоинфекций неотличимы друг от друга. Это мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами, их размер 1—3×0,6—0,8 мк. Сальмонеллы подвижны, обладают перитрихиально расположенными жгутиками (от 8 до 20). Спор и капсул не образуют. Аэробы, но могут развиваться и в условиях анаэробиоза. Образуют эндотоксин.

Культуральные свойства

Сальмонеллы нетребовательны к питательным средам. Хорошо растут на обычных средах: МПА и МПБ при слабощелочной реакции среды (pH 7,2—7,6) и темпера-

туре 37°. На поверхности мясо-пептонного агара через 24 часа эти бактерии образуют круглые, слегка выпуклые, блестящие, прозрачные в проходящем свете колонии в S-форме. В R-форме колонии более плоские, менее прозрачны, с неровными краями. Колонии свежевыделенной культуры сальмонелл паратифа В несколько отличаются от колоний сальмонелл тифа и паратифа А: они более крупные и мутные. После выдерживания культур сальмонелл паратифа В в термостате в течение 18—20 часов и пребывания при комнатной температуре в течение 1—2 суток на периферии колоний образуется слизистый вал. Валообразование является важным диагностическим признаком для отличия этих сальмонелл от возбудителей тифа и паратифа А.

На бульоне все сальмонеллы образуют равномерную муть.

При первичном посеве материала от больных сальмонеллы развиваются медленно. Для накопления их часто используют среды обогащения: 10—20% желчный бульон, среду Раппопорта, среду Мюллера, Кауфмана и селенитовый бульон. На среду Раппопорта и желчный бульон, засевают кровь, на селенитовый бульон, среды Мюллера и Кауфмана — испражнения и мочу.

Для выделения сальмонелл применяют дифференциальные среды Эндо, Левина, Плоскирева и висмут-сульфит-агар. Через 18—20 часов роста в термостате на первых трех средах сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний (так как не ферментируют лактозу, входящую в состав сред). На висмут-сульфит-агаре рост происходит медленнее и полностью колонии сальмонелл дифференцируются через 48 часов, отличаясь черным цветом от колоний других бактерий (табл. 27, рис. 28).

Контрольные вопросы

1. Опишите морфологию сальмонелл и их отношение к окраске по Граму.
2. На каких средах выращивают сальмонеллы?
3. Чем отличается рост колоний возбудителей паратифа В от роста других сальмонелл?
4. Какими средами пользуются для накопления сальмонелл?

Задание. 1. Изучите по табл. 27 характер роста сальмонелл на дифференциальных средах. 2. Посмотрите у преподавателя чашки с посевом сальмонелл тифа на средах Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит-агаре. Зарисуйте колонии цветными карандашами и покажите преподавателю.

Таблица 27

Рост сальмонелл на дифференциальных средах

Среда	Время роста	Колонии сальмонелл		
		брюшного тифа	паратифа А	паратифа В
Эндо	18—24 часа	Бесцветные, блестящие, прозрачные	Бесцветные, блестящие, прозрачные	Бесцветные, блестящие, прозрачные
Левина	18—24 »	То же	То же	То же
Плоскирева	18—24 »	» »	» »	» »
Висмут-сульфит-агар	18—24 » 48 часов	Зеленые Черные с зеленым ободком	Зеленые Черные с зеленым ободком	Зеленые

Примечание. На месте снятых колоний остается черный след (изменяется цвет среды).

Биохимические свойства

Бактерии рода Salmonella биохимически активны. Они расщепляют углеводы с образованием кислоты и газа, за исключением сальмонелл тифа, ферментирующих сахара с образованием только кислоты. Большинство сальмонелл расщепляет пептонсодержащие субстраты с образованием сероводорода, но возбудители паратифа А отличаются отсутствием этого признака. По отношению к лакмусовому молоку сальмонеллы неоднородны: возбудители тифа, паратифа А и некоторые другие сальмонеллы образуют кислоту, сальмонеллы паратифа В и большинство сальмонелл — щелочь. Сальмонеллы растут на бульоне без расщепления пептонов до индола, желатин не разжижают (табл. 28).

Изучение ферментативных свойств сальмонелл недостаточно для определения их типовой принадлежности, устанавливаемой с помощью серологических реакций.

Таблица 28

Ферментативные свойства сальмонелл

Название сальмонелл	Окраска по Граму	Рост на средах Гисса					Образование		Лакмусовое молоко	Желатин
		лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	H_2S	индола		
Тифа	Грамотрицательн.	—	К	—	К	К	+	—	К	—
Паратифа А	То же	—	КГ	—	КГ	КГ	—	—	К	—
Паратифа В	» »	—	КГ	—	КГ	КГ	+	—	Щ	—

Условные обозначения: К — образование кислоты; Г — образование газа; Щ — щелочение лакмусового молока.

КЛАССИФИКАЦИЯ САЛЬМОНЕЛЛ (АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА)

Сальмонеллы имеют сложную антигенную структуру. В состав их антигенного комплекса входят соматический О-антиген (термостабильный) и жгутиковый Н-антиген (термолабильный).

Уайт и Кауфман, изучавшие антигенную структуру сальмонелл, показали, что антигены эти неоднородны и состоят из отдельных компонентов. По характеру О-антигенов все сальмонеллы разделены на **серологические О-группы**, обозначаемые прописными буквами латинского алфавита — A, B, C, D, E и т. д. (всего 65 групп). Внутри каждой группы имеется несколько О-антигенов, которые обозначают арабскими цифрами 1, 2, 3, 4, 5 и т. д. Например, О-антиген группы В может иметь 4 различных компонента 1, 4, 5 и 12 (табл. 29).

Жгутиковые Н-антигены также неоднородны. Они состоят из двух фаз — первой и второй. Каждая фаза состоит из отдельных антигенов. Рецепторы первой фазы обозначают строчными буквами латинского алфавита, рецепторы второй фазы — цифрами и строчными латинскими буквами.

Большинство сальмонелл имеют обе фазы Н-антигена, некоторые — только одну, например сальмонеллы паратифа А, тифа и др. (см. табл. 29).

Кроме указанных антигенов, в свежевыделенных культурах сальмонелл тифа был обнаружен антиген, который назвали vi-антигеном (связывая его с вирулентностью

Таблица 29

Сокращенная схема антигенной структуры бактерий рода Salmonella по Кауфману—Уайту

Группа	Вид и тип	Соматический О-антиген	Н-антиген	
			1-я фаза	2-я фаза
A	S. paratyphi A	1, 2, 12	a	—
B	S. paratyphi B	1, 4, 5, 12	b	1,2
	S. typhimurium	1, 4, 5, 12	i	1,2
	S. heidelberg	4, 5, 12	r	1,2
	S. derby	1, 4, 12	f, g	—
C	S. paratyphi C	6, 7, vi	c	1,5
	S. cholerae suis	6, 7	c	1,5
	S. newport	6, 8	e, h	1,2
	S. praha	6, 8	y	1,5
	S. duesseldorf	6, 8	z_4z_{24}	
D	S. typhi	9, 12, vi	d	—
	S. enteritidis	1, 9, 12	gm	—
	S. dublin	1, 9, 12	gp	—
	S. moscow	9, 12	gq	—
	S. gallinarum	1, 9, 12	—	—
E	S. anatum	3, 10	e, h	1,6
	S. london	3, 10	1, v	1,6
	S. amager	3, 10	y	1,2
	S. orion	3, 10	y	1,5
	S. bolton	3, 10	y	enz_{15}
	S. harrisonburg	(3), (15)	—	—

выделенного штамма). Vi-антиген располагается на поверхности клеточной стенки микробной клетки. Он малоустойчив к действию температуры, спирта, кислот и т. д. В дальнейшем было показано, что vi-антиген имеется у сальмонелл паратифа С.

Для определения антигенной структуры сальмонелл существуют **монорецепторные сыворотки.** Эти сыворотки готовят в производственных условиях. Каждая сыворотка содержит антитела (агглютинины), соответствующие определенному О- или Н-антигену. Монорецепторные сыво-

ротки используют только для постановки реакции агглютинации на стекле.

Изучение антигенной структуры выделенного штамма начинают с реакции агглютинации поливалентной О-сывороткой (А, В, С, D, Е). В случае отсутствия агглютинации культуру испытывают поливалентной сывороткой к сальмонеллам редких групп. Определив принадлежность изучаемой культуры к роду Salmonella, определяют О-группу, используя для этого монорецепторные О-сыворотки. Идентификацию заканчивают, определяя серотип при помощи Н-сывороток первой и второй фаз.

Контрольные вопросы

1. Кто впервые изучил антигенную структуру сальмонелл?
2. Какие антигены входят в состав сальмонелл?
3. Каким образом можно определить серологический тип сальмонеллы?
4. Как обозначают О-антигены?
5. Как обозначают Н-антигены, сколько они имеют фаз, с какой структурной частью клетки связаны?
6. Какие из представителей сальмонелл имеют vi-антиген?
7. В какой реакции определяют антигенную структуру сальмонелл?
8. Какими сыворотками начинают определение антигенной структуры сальмонелл?

Задание. Возьмите у преподавателя диагностикумы из сальмонелл паратифа В О- и Н-монорецепторные сыворотки и поставьте реакцию агглютинации на стекле. Учтите реакцию и покажите преподавателю.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

При температуре 60° сальмонеллы погибают в течение 15 минут, при 100° — мгновенно.

Низкие температуры эти бактерии переносят хорошо.

В чистой воде они могут сохраняться несколько месяцев, в грязной погибают быстро, во льду сохраняются также в течение нескольких месяцев.

Общеупотребительные растворы химических веществ — сулема 1 : 1000, 5% фенол — убивают их в течение нескольких минут.

Задание. Заполните форму № 25, указав характер роста, биохимические свойства и отношение сальмонелл к физическим и химическим факторам.

Форма № 25

Рост на средах							Биохимические свойства					Устойчивость к физическим и химическим факторам			
							образование					температура			
Эндо	Плоскирева	висмут-сульфит-агар	лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	H_2S	индола	лакмусовое молоко	желатин	50—60°	низкая, 0° и ниже	сулема 1:1000	5% фенол

Материалом для исследования при подозрении на брюшной тиф являются:

1) кровь,
2) испражнения,
3) моча,
4) дуоденальное содержимое.

В зависимости от стадии болезни исследуют разный материал.

Исследованию могут быть подвергнуты содержимое розеол, костный мозг, мокрота и секционный материал — кусочки органов.

При токсикоинфекциях материалом для исследования могут служить промывные воды желудка, рвотные массы, остатки пищевых продуктов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение возбудителей заболевания и определение серотипа сальмонелл.

Характер материала	Способ сбора материала
Кровь (ранняя диагностика)	В количестве 10—20 мл берут стерильным шприцем из локтевой вены и засевают у постели больного на флаконы со средой обогащения (среда Раппопорта или 10—20% желчный бульон). Во флаконы со средой Раппопорта помещают

Характер материала	Способ сбора материала
	поплавок, в который попадает образовавшийся газ, что позволяет предположить накопление в среде возбудителей паратифов. На высоте лихорадочного периода достаточно взять для посева 10 мл крови. После понижения температуры количество бактерий в крови уменьшается, поэтому следует брать 15—20 мл крови. Засевают кровь в колбы со средой в соотношении 1:10, например 10 мл крови на 100 мл среды. Флаконы с посевом ставят в термостат. На следующий день вынимают из термостата, просматривают и независимо от внешне выраженных признаков роста производят пересев на плотные среды Эндо, Плоскирева. При отсутствии роста флаконы с посевом оставляют в термостате до 7 дней. При отсутствии роста на чашках через каждые 2 дня повторяют высевы на дифференциальные среды. Отсутствие роста после 7-го дня позволяет дать отрицательный ответ. При наличии роста и подозрительных колоний выделяют чистую культуру, ставят в термостат. Дальнейшее исследование ведут по общей схеме (см. стр. 183).*
Исследование испражнений	3—5 г испражнений помещают в баночку или пробирку с 30% глицериновой смесью. Производят посев на дифференциальные среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит-агар и на одну из сред обогащения: селенитовую, Мюллера или Кауфмана с последующим, через 24 часа, пересевом на дифференциальные среды. Таким образом, посев на дифференциальные среды производят дважды с интервалом в один день.** Метод посева: собранный материал путем встряхивания эмульгируют в консервирующей смеси, затем стеклянной палочкой или трубочкой одну каплю эмульсии наносят на поверхность питательной среды в чашках Петри и досуха втирают стеклянным шпателем сначала на месте посева,

* Примечание. Культура, выделенная из крови, называется гемокультурой. При токсикоинфекциях период бактериемии короткий.

** Примечание. Сохранять собранный материал в глицериновой смеси можно 6—8 часов (лучше на холоде).

Характер материала	Способ сбора материала
	а затем по всей поверхности среды. Такой способ посева позволяет получить изолированные колонии. Засеянные чашки ставят в термостат. Через 18—24 часа чашки вынимают из термостата, просматривают и при наличии подозрительных колоний выделяют чистую культуру. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183). При отсутствии подозрительных колоний дают отрицательный ответ.
Исследование мочи	Мочу лучше брать стерильно катетером. При отсутствии такой возможности поступают следующим образом: до взятия мочи наружное отверстие мочеиспускательного канала обмывают физиологическим раствором. Первую порцию мочи сливают. После этого 20—50 мл мочи собирают в стерильную посуду и центрифугируют или отстаивают. Производят посев осадка на дифференциальные среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит-агар и на одну из сред обогащения — селенитовую, Мюллера или Кауфмана—с последующим, через 24 часа, пересевом на дифференциальные среды. Посевы ставят в термостат. На следующий день при наличии подозрительных колоний выделяют чистую культуру. Дальнейшее исследование проводят по обычной схеме (см. стр. 183).
Исследование содержимого розеол	Участок кожи с выраженными розеолами протирают спиртом, промывают физиологическим раствором и стерильным скальпелем скарифицируют поверхность розеол. На скарифицированный участок кожи наносят каплю 10—20% желчного бульона, который смешивается с содержимым розеол. Несколько капель этой смеси насасывают пастеровской пипеткой. Тонкий конец пипетки запаивают и отсылают в лабораторию. В лаборатории собранный материал засевают на дифференциальные среды (в чашках Петри) и на среду обогащения: 10—20% желчный бульон. Посевы ставят в термостат. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183).
Исследование костного мозга	Возбудители брюшного тифа и паратифов могут длительно сохраняться в костном мозге. Для получения содержимого костного мозга (миелокультуры) пользуются стернальной пункцией. Полученный пунктат засевают на среду обогащения с

Характер материала	Способ сбора материала
	последующим, через 24 часа, пересевом на дифференциальные среды. Дальнейшее исследование проводят по обычной схеме (см. стр. 183).
Исследование мокроты	Мокроту собирают в стерильные баночки. При наличии гнойных комков их подхватывают петлей и засевают на плотные дифференциальные среды. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183).
Исследование дуоденального содержимого	Исследование желчи можно производить с первых дней заболевания, в течение всего лихорадочного периода и в период реконвалесценции. Обычно желчь исследуют для выявления бактерионосительства у реконвалесцентов (выздоравливающих) и у здоровых людей.*
	Желчь собирают натощак путем дуоденального зондирования в стерильные пробирки, раздельно порции А, В и С. Посев можно производить из отдельных порций и из их смеси. Так как сама желчь является питательной средой для сальмонелл, то полученную желчь инкубируют в термостате. На следующий день производят посев на дифференциальные среды. При отсутствии роста после первого высева желчь оставляют в термостате на 10 дней, периодически производя высевы через 2 дня.
	Если на плотных средах вырастают подозрительные колонии, то их исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183).
Промывные воды желудка	Собранные в стерильную посуду промывные воды центрифугируют. Осадок засевают на дифференциальные среды и на среды накопления. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183).
Рвотные массы	Если рвотные массы густой консистенции, их добавляют в физиологический раствор в соотношении 1:10. Две — три капли из верхнего слоя засевают на дифференциальные среды и среды накопления. Рвотные массы жидкой консистенции засевают непосредственно на питательные среды. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме (см. стр. 183).**

* Примечание. Зондирование производят в лечебном учреждении.

** Примечание. Если рвотные массы или промывные воды желудка имеют кислую реакцию, то перед посевом их нейтрализуют 5—10% раствором соды.

Характер материала	Способ сбора материала
Пищевые продукты	Жидкие или полужидкие продукты тщательно размешивают, 2—3 капли засевают на дифференциальные среды и среды накопления. Плотные продукты — стерильным шпателем или ножом берут 5—10 г из глубины, эмульгируют в физиологическом растворе в соотношении 1:5 или 1:10 и засевают на дифференциальные среды и среды накопления. Если вырастают подозрительные колонии, исследование ведут по общей схеме (см. стр. 183).
Исследование секционного материала	Исследуют кусочки органов: печени, селезенки, почек, костного мозга, тонкого кишечника (стенки и содержимого), а также кровь и желчь. Кровь и желчь набирают пастеровской пипеткой, место введения пипетки предварительно прижигают нагретым на спиртовке скальпелем. Кусочки органов берут стерильными ножницами и пинцетом и помещают в стерильную посуду (лучше всего в чашки Петри). Затем их растирают в стерильной ступке и производят посев на дифференциальные среды и среды обогащения, обеспечивающие накопление сальмонелл и подавление роста других микроорганизмов. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме. Независимо от характера взятого для исследования материала с момента выделения чистой культуры исследование ведут по общей схеме (см. стр. 183).

Контрольные вопросы

1. Какой материал исследуют при тифе, паратифе и токсикоинфекциях?
2. В каком периоде заболевания используют метод выделения гемокультуры?
3. В каком периоде болезни берут для исследования испражнения и мочу?
4. В каком периоде заболевания ставят серологические реакции?
5. С какой целью исследуют желчь?

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Методика исследования
Собранный и подготовленный для посева материал (см. предыдущую схему)	**Первый день исследования** Посев материала на дифференциальные среды Плоскирева, Эндо, висмут-сульфит-агар и на среды обогащения (селенитовую и другие среды).* **Второй день исследования** Вынимают чашки из термостата (инкубация в термостате 18—24 часа) и просматривают выросшие колонии в проходящем свете простым глазом и при помощи лупы. Несколько (5—6) подозрительных колоний (см. рис. 28) выделяют на среду Ресселя. Посев производят следующим образом: снятую колонию осторожно, не задевая края пробирки, вносят в конденсационную жидкость, затем штрихами засевают всю скошенную поверхность среды и делают укол в глубину столбика для выявления газообразования. Укол следует производить в центр агарового столбика. Пробирки с посевом на среде Ресселя ставят в термостат. Если исследуемый материал был посеян на среду обогащения, то через 18—20 часов производят высев со среды обогащения на чашки с дифференциальными средами. Дальнейшее исследование ведут по обычной схеме. **Третий день исследования** Вынимают пробирки с засеянной средой Ресселя из термостата и просматривают характер роста. В состав среды Ресселя входят лактоза, глюкоза, мочевина и индикатор. Расщепление глюкозы происходит только в условиях анаэробиоза. Поэтому скошенная поверхность среды не изменяется, а столбик при расщеплении глюкозы окрашивается в цвет, соответствующий индикатору. Бактерии, разлагающие лактозу и мочевину, изменяют цвет всей среды (рис. 29).

* Примечание. На среду Плоскирева засевают в два раза больше материала, чем на среду Эндо, так как в первой имеются факторы, задерживающие рост; на селенитовую среду посев производят в соотношении 1:5. Посевы ставят в термостат.

Характер материала	Методика исследования
	Если выделенные культуры сбраживают лактозу или расщепляют мочевину, меняя цвет всей среды, то они не являются сальмонеллами. Это позволяет дать отрицательный ответ. Культуру, расщепляющую только глюкозу, подвергают дальнейшему изучению: делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. При наличии в мазках грамотрицательных палочек изучают подвижность и биохимические свойства. Подвижность можно определить в висячей или раздавленной капле, а также по росту в полужидкой среде Гисса или в 0,2% агаре. При наличии подвижности при посеве уколом рост на среде диффузный, среда мутнеет. Для выявления биохимической активности производят посев на среды Гисса, мясо-пептонный бульон с двумя индикаторными бумажками для определения наличия сероводорода и индола и на лакмусовое молоко. **Четвертый день исследования** Учитывают биохимическую активность по результату (см. табл. 27) ферментации углеводов и других сред. Определив морфологические, культуральные и ферментативные свойства выделенной культуры, необходимо провести анализ антигенной структуры. Серологическую идентификацию сальмонелл начинают с реакции агглютинации на стекле с поливалентной О-сывороткой ABCDE. При отсутствии реакции агглютинации выделенную культуру испытывают с поливалентной О-сывороткой к редким группам сальмонелл. При положительной реакции агглютинации с одной из поливалентных сывороток культуру испытывают с каждой О-сывороткой, антитела в которой соответствуют составу поливалентной, для определения принадлежности ее к одной из О-групп. Установив принадлежность культуры к определенной О-группе, ее испытывают с Н-сыворотками первой, а затем второй фазы.

Таблица 30

Антигенная структура возбудителей брюшного тифа и паратифов А и В

Название сальмонелл	О-группа	О-антигены (соматические)	Н-антигены	
			1-я фаза	2-я фаза
Паратифа А	А	1, 2, 12	a	—
Паратифа В	В	1, 4, 5, 12	b	1,2
Тифа	D	1, 9, 12 (vi)	d	—

Если выделена культура сальмонелл тифа, то ставят еще реакцию агглютинации с vi-сывороткой для определения наличия vi-антигена. Возбудители брюшного тифа, содержащие vi-антиген, лизируются vi-бактериофагом. vi-бактериофаги высокоспецифичны. С помощью vi-бактериофагов (их 86) производят определение фаготипа сальмонелл.

Определение vi-фаготипа подтверждает диагноз и имеет большое эпидемиологическое значение.

МЕТОДИКА ФАГОТИПИРОВАНИЯ

Первый метод. В чашки Петри наливают 20—25 мл агара и подсушивают с открытыми крышками в термостате. Затем дно чашки делят на секторы. На каждом секторе пишут наименование фага. Фаготипируют 4—6-часовую бульонную культуру, так как она содержит большое количество vi-антигена. На поверхность агара наносят 8—10 капель бульонной культуры и стеклянным шпателем растирают ее по поверхности агара. Чашки с посевами подсушивают с открытыми крышками в термостате. Затем на каждый сектор наносят каплю соответствующего типового фага. После подсыхания капель чашки закрывают и ставят в термостат на 18—24 часа. Результат учитывают невооруженным глазом или с помощью лупы через дно чашки.

Наличие лизиса культуры одним или несколькими типовыми фагами позволяет определить принадлежность выделенного штамма к определенному фаготипу.

Выраженность лизиса записывают знаком плюс (++++, +++, ++).

Второй метод. На питательную среду культуру наносят каплями. На каждую каплю после подсыхания культуры в термостате наносят каплю типового фага. Ставят в термостат. Степень лизиса выражают по четырехкрестной системе.

Контрольные вопросы

1. В чем эмульгируют собранный для исследования материал?
2. Расщепление каких углеводов позволяет дать отрицательный ответ?
3. На какие дифференциально-диагностические среды производят посев исследуемого материала?
4. Какие среды используют для накопления сальмонелл?
5. Почему на среду Плоскирева засевают большее количество материала, чем на среду Эндо?
6. С какой целью при посеве на среду Ресселя производят укол в глубину столбика?
7. Что определяют при помощи О-монорецепторных сывороток?
8. Что определяют при помощи Н-монорецепторных сывороток?
9. Какой сывороткой определяют наличие vi-антигена?
10. Какое значение имеет определение vi-фаготипа?

Задание. Возьмите у преподавателя чашку Петри, на которой произошел фаголизис сальмонелл тифа. Изучите лизис при помощи лупы. Определите фаготип возбудителей брюшного тифа. Зарисуйте в тетради и покажите преподавателю.

Примечание. Чашки с культурой сальмонелл тифа должны быть предварительно обезврежены — между крышкой и чашкой прокладывают вату, смоченную хлороформом.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРЮШНОГО ТИФА И ПАРАТИФОВ

Реакция Видаля *. Со второй недели заболевания в крови больных накапливаются антитела против возбудителя инфекции. Для их выявления исследуют сыворотку крови больного в реакции агглютинации. В качестве антигена используют убитые культуры сальмонелл — диагностикумы.

Для постановки реакции Видаля используют: сыворотку больного; набор диагностикумов; физиологический раствор.

Кровь (2—3 мл) собирают в стерильную пробирку из мякоти пальца или локтевой вены и доставляют в лабораторию. В лаборатории пробирку ставят в термостат на

---

* Примечание. Реакция Видаля — вспомогательное исследование. Служит для выявления специфических антител в крови.

20—30 минут для образования сгустка, затем пастеровской пипеткой обводят сгусток, чтобы отделить от стенки пробирки, и ставят на 30—40 минут на холод. Отделившуюся сыворотку отсасывают и ставят реакцию агглютинации с диагностикумами из сальмонелл тифа и паратифов. Для получения сыворотки кровь можно отцентрифугировать.

При возникновении инфекционного процесса — брюшного тифа или паратифов — в организме вырабатываются О- и Н-антитела к одноименным антигенам возбудителя.

О-антитела появляются первыми и исчезают довольно быстро, Н-антитела сохраняются долго. То же самое происходит и при вакцинации. Поэтому положительная реакция Видаля с О- и Н-антигенами свидетельствует о наличии заболевания, а реакция только с Н-антигенами может быть и у переболевших («анамнестическая реакция»), и у привитых («прививочный Видаль»). Исходя из этого, реакцию Видаля ставят раздельно с О- и Н-антигенами (диагностикумами).

Так как клинически брюшной тиф и паратифы А и В сходны, то для выявления природы заболевания сыворотку больного испытывают также одновременно с диагностикумами из сальмонелл тифа и паратифов А и В.

Реакцию Видаля широко используют, так как она проста и не требует специальных условий.

Поставить реакцию можно двумя способами: капельным и объемным (см. гл. 5). В практике чаще используют объемный метод. При постановке линейной реакции агглютинации количество рядов должно соответствовать количеству антигенов (диагностикумов). Возбудителем заболевания считают микроорганизм, диагностикум из которого агглютинировался сывороткой больного. Иногда отмечают групповую агглютинацию, так как возбудители тифа и паратифов обладают общими групповыми антигенами. В этом случае положительным считают результат реакции в ряду, в котором агглютинацию отмечают в большем разведении сыворотки (см. табл. 31).

Если агглютинация возникает только в небольших разведениях сыворотки — 1 : 100, 1 : 200, то для отличия реакции при заболевании от прививочной или анамнестической прибегают к повторной постановке реакции агглютинации через 5—7 дней. У больного титр антител увеличивается, а у привитого или переболевшего не изме-

няется. Таким образом, нарастание титра антител служит показателем заболевания (табл. 31).

Таблица 31

Возможный результат реакции агглютинации

Диагностикумы из сальмонелл	Первичное исследование				Повторное исследование			
	сыворотки больного X.							
	разведения сыворотки							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800
Тифа «О»	+	+	—	—	+	+	+	+
Тифа «Н»	+	+	—	—	+	+	—	—
Паратифа А «О»	+	—	—	—	+	—	—	—
Паратифа А «Н»	+	—	—	—	+	—	—	—
Паратифа В «О»	+	—	—	—	+	—	—	—
Паратифа В «Н»	+	—	—	—	+	—	—	—

В ответ на внедрение в организм возбудителей брюшного тифа, обладающих vi-антигеном, в крови больного появляются агглютинины. Их выявляют со второй недели болезни, но титр их обычно не превышает 1 : 100. Обнаружение vi-антител связывают с наличием в организме возбудителей брюшного тифа. Поэтому определение этих антител имеет большое эпидемиологическое значение, так как позволяет выявить бактерионосителей.

Наиболее чувствительной реакцией для выявления vi-антител является реакция vi-гемагглютинации.

Принцип реакции заключается в том, что эритроциты человека (I группы) или барана после специальной обработки могут адсорбировать на своей поверхности vi-антиген и приобретают при этом способность агглютинироваться соответствующими vi-антителами.

Эритроциты с адсорбированными на поверхности антигенами называются эритроцитарными диагностикумами.

Для постановки реакции vi-гемагглютинации берут: 1) сыворотку крови больного (1—2 мл); 2) эритроцитар-

ный сальмонеллезный vi-диагностикум; 3) vi-сыворотку; 4) О-сыворотку; 5) физиологический раствор.

Реакцию ставят в агглютинационных пробирках или в полистероловых пластинках с лунками.

Постановка реакции гемагглютинации. Кровь у больного берут так же, как для реакции Видаля. Получают сыворотку.

Из сыворотки готовят двукратные серийные разведения, начиная с 1 : 10 до 1 : 160.

По 0,5 мл каждого разведения вносят в лунку и прибавляют по 0,25 мл эритроцитарного диагностикума. Реакцию ставят в объеме 0,75 мл.

Контролем служат: 1) стандартная агглютинирующая монорецепторная vi-сыворотка — реакция должна быть положительной до титра сыворотки; 2) физиологический раствор (для контроля диагностикума) — реакция должна быть отрицательной.

Содержимое лунок тщательно перемешивают, ставят в термостат на 2 часа и оставляют при комнатной температуре до следующего дня (на 18—24 часа).

Учет как всегда начинают с контроля.

Реакцию оценивают в зависимости от степени агглютинации диагностикума.

Результаты учитывают по четырехкрестной системе:

Реакция ++++ эритроциты полностью агглютинированы. На дне лунки кольцо

Реакция +++ кольцо меньше, не все эритроциты агглютинировались

Реакция ++ кольцо маленькое. На дне пробирки имеется осадок из неагглютинированных эритроцитов

Реакция отрицательная (—) — эритроциты не агглютинировались и осели на дно пробирки в виде пуговки.

Контрольные вопросы

1. В какой период заболевания ставят реакцию Видаля?
2. Какие ингредиенты необходимы для постановки реакции Видаля?
3. С какими диагностикумами ставят реакцию Видаля?
4. Какие существуют методы постановки реакции Видаля?
5. Как можно с помощью реакции Видаля отличить истинное заболевание от анамнестического и прививочного накопления антител?
6. Что выявляют при помощи реакции vi-гемагглютинации?

Задание. 1. Возьмите у преподавателя О- и Н-диагностикумы из сальмонелл тифа, паратифа А и паратифа В и сыворотку больного и поставьте реакцию Видаля. 2. Заполните форму № 26, указав схему бактериологического исследования по дням.

Форма № 26

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Среды Левина, Плоскирева, висмут-сульфит-агар выпускаются медицинской промышленностью в виде сухого порошка. Их готовят согласно указаниям на этикетке: отвешивают определенное количество сухой среды, растворяют в соответствующем количестве воды, кипятят и разливают в стерильные чашки Петри.

Среда Ресселя. В 950 мл дистиллированной воды добавляют 40 г сухой питательной среды с лактозой и индикатором и прибавляют 5 г питательного агара. Нагревают до кипения и растворения порошков. В 50 мл дистиллированной воды растворяют 1 г химически чистой глюкозы и добавляют к приготовленной смеси. Среду разливают в стерильные пробирки по 5—7 мл, стерилизуют текучим паром (2 дня по 20 минут) и скашивают так, чтобы оставался столбик. Среду Ресселя с маннитом и сахарозой готовят также.

Глава 14. ШИГЕЛЛЫ

Семейство кишечных, род Shigella.

Первый представитель рода Шигелла был открыт русским ученым Григорьевым в 1891 г., а в 1898 г. японский ученый Шига описал его. В последующие годы были выделены и описаны другие представители шигелл: Штуцера — Шмитца; Лардж — Сакса; обширная группа Ши-

гелл Флекснера с подвидами Ньюкастл и Бойда; Зонне (табл. 33). Отдельные виды и типы рода Шигелла различают по антигенному строению и биохимическим свойствам.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ШИГЕЛЛАМИ

Шигеллы вызывают острое инфекционное заболевание с поражением слизистой оболочки толстого кишечника. Источником заболевания является больной человек. Попав в организм, возбудители дизентерии локализуются в слизистой оболочке толстого кишечника, вызывая воспаление и некроз. После отторжения некротических масс на местах некроза образуются язвы, регенерирующие в период реконвалесценции. Путь проникновения алиментарный (через рот).

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Шигеллы — небольшие грамотрицательные палочки (2—3×0,3—0,6 мк). Неподвижны в отличие от других представителей семейства кишечных. Образуют эндотоксин. Исключением являются Шигеллы дизентерии Григорьева — Шига, которые образуют экзотоксин.

Контрольные вопросы

1. Назовите представителей рода Шигелла?
2. Какое заболевание вызывают шигеллы и какую часть кишечника они поражают?
3. Назовите ворота проникновения шигелл?
4. Опишите морфологию шигелл и отношение их к окраске по Граму?
5. По каким свойствам различают отдельных представителей шигелл?

Задание. Возьмите у преподавателя культуру бактерий дизентерии. Сделайте мазок, зафиксируйте и окрасьте по Граму. Изучите под микроскопом, зарисуйте цветными карандашами и покажите преподавателю.

Внимание! Работайте осторожно.

Культуральные свойства

Шигеллы — аэробы, но могут расти и в условиях анаэробиоза. Размножаются они при температуре 37° и pH среды 7,2—7,4. Все шигеллы хорошо размножаются на

обычных питательных средах МПА и МПБ. Элективными и дифференциально-диагностическими средами для их выращивания служат среды Плоскирева, Эндо и Левина. На всех этих средах шигеллы растут в виде небольших круглых, выпуклых, сероватых, прозрачных колоний. На бульоне образуется равномерная муть. Исключением являются Шигеллы зонне, которые часто растут в R-форме в виде крупных, плоских, мутных, с изрезанными краями колоний. R-форма колоний хорошо выражена на простом агаре и дает образование осадка на жидких средах.

Биохимические свойства

Ферментативная активность шигелл хорошо выражена (табл. 32). По отношению к манниту шигеллы делят на нерасщепляющие и расщепляющие маннит.

Таблица 32

Ферментативные свойства шигелл

Шигеллы	Лактоза	Глюкоза	Сахароза	Маннит	Мальтоза	Лакмусовое молоко	Желатин	Образование	
								индола	сероводорода
Григорьева—Шига	—	К	—	—	К	К	—	—	—
Штуцера — Шмитца	—	К	—	—	К	К	—	+	—
Лардж—Сакса	—	К	—	—	К	К	—	±	—
Флекснера	—	К	—	К	К	К	—	±	±
Ньюкастл	—	К	—	К	К	К	—	—	—
Бойда	—	К	—	К	К	К	—	—	—
Зонне	К (на 2—3-й день)	К	К (поздно 6—7-й день)	К	К	К	—	—	—

Условные обозначения: К — образование кислоты; + расщепление субстрата до индола; ± непостоянное продуцирование индола и сероводорода.

К первой группе относятся Шигеллы дизентерии Григорьева — Шига, Штуцера — Шмитца, Лардж — Сакса и

провизорные (т. е. «временные», еще не получившие окончательного названия), ко второй группе — Шигеллы флекснера с подвидами Ньюкастл и Бойда и Зонне.

Контрольные вопросы

1. На каких средах выращивают шигеллы?
2. Какие среды являются элективными дифференциально-диагностическими?
3. Какой вид шигелл часто растет в R-форме?
4. Какие бактерии из группы шигелл обладают наибольшей биохимической активностью?
5. Отношение к какому углеводу положено в основу разделения шигелл на две группы?
6. Какие виды шигелл входят в эти группы?
7. На чем основана классификация шигелл?

Задание. Изучите по табл. 32 ферментативные свойства шигелл.

КЛАССИФИКАЦИЯ ШИГЕЛЛ

Шигеллы содержат соматические О- и К-антигены, в состав которых входят групповые и типовые антигены.

На основании антигенной структуры составлена современная классификация (международная и советская).

Задание. Ознакомьтесь с советской классификацией по табл. 33.

Таблица 33

Классификация шигелл

Вид	Подвид	Типовой антиген	Групповой антиген	Тип	Подтип
Григорьева—Шига				1	
Штуцера—Шмитца				2	
Лардж—Сакса				3	
				4	
				5	
				6	
				7	
Провизорные				8	
				9	
				10	

Продолжение

Вид	Подвид	Типовой антиген	Групповой антиген	Тип	Подтип
Флекснера	Флекснера	I	3,4	1	1a
		I	3,4; 6		1b
		II	3,4	2	2a
		II	7,8		2b
		III	6; 7,8	3	3a
		III	3,4; 6; 7,8		3b
		III	(3,4)6		3c
		IV	3,4	4	4a
		IV	(3,4)6		4b
		V	7,8	5	5x+
		V	(3,4)		5x—
		—	7,8		X-вариант
		—	3,4		
	Ньюкастл Бойда	VI	(3,4)	6	Y-вариант
				1	
				2	
				3	
				4	
				5	
				6	
				7	
				8	
				9	
				10	
				11	
				12	
				13	
				14	
				15	
Зонне					

В настоящее время Шигеллы зонне делят на 4 ферментативных типа. Различаются они по способности расщеплять рамнозу и ксилозу (табл. 34).

Определение типов Шигелл зонне имеет эпидемиологическое значение.

Контрольные вопросы

1. Какие шигеллы имеют типовые антигены?
2. Какие шигеллы имеют типовые и груповые антигены?

Таблица 34

Тип шигелл Зонне	Расщепление углеводов	
	рамноза	ксилоза
I	+	—
II	(+)	—
III	+	+
IV	+	(+)

Условные обозначения: + расщепление; (+) расщепление через 3—5 дней; — не изменяется

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Шигеллы довольно устойчивы к влиянию внешних воздействий. При температуре 60° шигеллы погибают через 20—30 минут; температура 100° убивает мгновенно, прямой солнечный свет убивает их через 2—3 часа (Шигеллы дизентерии Григорьева — Шига — через 20 минут), в водопроводной воде шигеллы сохраняются до 13—15 суток, в речной воде — до 3 месяцев, в овощах и фруктах — до 10—12 дней, в молочных продуктах — до 8 дней. Устойчивость шигелл имеет значение, так как перечисленные объекты: вода, овощи, фрукты, молочные продукты — пути передачи дизентерии.

В испражнениях, находящихся во внешней среде, шигеллы сохраняются от 15 суток до 3 месяцев.

В кишечнике мух и на поверхности их тела шигеллы сохраняются до 5 дней, что имеет большое эпидемиологическое значение, так как мухи являются переносчиками дизентерии.

Общеупотребительные растворы дезинфицирующих веществ (3% хлорамин, сулема в разведении 1 : 1000) убивают шигелл через 20—30 минут.

Задание. Заполните форму № 27, указав характер роста шигелл, биохимические свойства и отношение шигелл к физическим и химическим факторам.

Форма № 27

| Отношение к физическим и химическим факторам | | |

Форма № 27

Рост на средах				Биохимические свойства									Отношение к физическим и химическим факторам			
											образование		температура		дезинфицирующие вещества	
															растворы	
Плоскирева	Эндо	Левина	бульон	лактоза	глюкоза	сахароза	маннит	мальтоза	лакмусовое молоко	желатин	индола	сероводорода	60°	100°	3% фенол	1:1000 сулема

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение и идентификация шигелл для постановки диагноза; выявление бактерионосителей; обнаружение шигелл в пищевых продуктах.

Характер материала	Сбор материала
Испражнения	Материал собирают с первых дней заболевания. Брать следует первые порции кала, так как шигеллы локализуются в слизистой оболочке толстого кишечника. 3—5 г испражнений, взятых из подкладного судна или горшка, помещают в глицериновую смесь. Сбор материала можно производить следующими способами: 1) ректальными трубками; 2) стеклянными трубками с опаянными концами; 3) ватными тампонами; 4) исследованием промывных вод кишечника. Ректальная трубка — это стеклянная трубка диаметром до 15 мм для взрослых и 8—10 мм для детей. Нижний конец ее закрыт. С двух противоположных концов его имеются два опаянных отверстия. Трубку вводят в прямую кишку. При обратном вытягивании трубки в отверстия попадает кал и собирается в ее запаянном конце. Ректальную трубку можно вводить на 20—25 см (взрослым). Обыкновенные стеклянные трубки с опаянным концом и ватные тампоны вводят на меньшее расстояние. Промывные воды получают при помощи клизм.
Секционный материал	Взятые отрезки толстой кишки (2—3) растирают в ступке, прибавляют физиологический раствор в соотношении 1:5; 1:10; полученную суспензию засевают (иногда для лучшего измельчения растирают со стерильным песком).
Пищевые продукты	Материал для исследования собирают так же, как и при токсикоинфекциях (см. стр. 181).

Контрольные вопросы

1. Какой материал служит для исследования?
2. Перечислите способы сбора материала?

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Методика исследования
Испражнения	**Первый день исследования** При наличии в испражнениях гноя, слизи и крови эти примеси захватывают петлей, промывают физиологическим раствором и наносят на чашку Петри с дифференциальной средой. Испражнения в глицериновой смеси эмульгируют (размешивают), каплю эмульсии наносят на среду. Материал, собранный ватным тампоном, втирают в среду. Дифференциальными средами для шигелл являются среда Плоскирева, Эндо и Левина. Среда Плоскирева является, кроме того, элективной, т. к. подавляет рост кишечной палочки и препятствует размножению бактериофага, который нередко находится в выделяемой культуре. Для получения изолированных колоний чашки Петри со средой перед посевом подсушивают в термостате. Затем на среду наносят каплю исследуемого материала, растирают его шпателем на ограниченном участке, после чего втирают по всей поверхности среды. При посевах на две или три чашки каждый раз берут новую порцию материала, что увеличивает возможность выделения шигелл. С тех пор как для лечения дизентерии стали широко использовать антибиотики (левомицетин, синтомицин), появились штаммы шигелл, устойчивые к этим антибиотикам. Поэтому было предложено добавлять к средам растворы часто употребляемых антибиотиков. Параллельно с прямым посевом собранный материал засевают на среду обогащения — селенитовый бульон. Посев производят в соотношении 1:5 с последующим пересевом (через 18—24 часа) на дифференциальные среды. Все посевы ставят в термостат. **Второй день исследования** Засеянные чашки вынимают из термостата, просматривают невооруженным глазом или через

Характер материала	Методика исследования
	лупу. Подозрительные колонии в количестве 4—6 отсевают на среду Ресселя. Посев производят штрихами по скошенной поверхности и уколом в агаровый столбик. Засеянную среду Ресселя помещают в термостат на 18—24 часа. Если на чашках после прямого посева или пересева со сред обогащения подозрительные колонии отсутствуют, дают отрицательный ответ. Третий день исследования Вынимают посевы, сделанные на среду Ресселя, из термостата. Культуры, не расщепившие лактозу, подвергают дальнейшему изучению: делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных палочек производят посев на среды Гисса, на бульон с индикаторными бумажками (для выявления индола и сероводорода) и на лакмусовое молоко. Засеянные среды ставят в термостат на 18—24 часа. Четвертый день исследования Вынимают посевы из термостата и учитывают результат. Культуры, подозрительные по своим ферментативным и культуральным свойствам в отношении шигелл (см. табл. 32), подвергают серологической идентификации. При отсутствии таких культур дают отрицательный ответ.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Вид, подвид, тип и подтип выделенной культуры устанавливают при помощи адсорбированных сывороток.

Анализ антигенной структуры начинают с реакции агглютинации на стекле со смесью № 1. В эту смесь входят сыворотки к Шигеллам зонне, ньюкастл и поливалентная сыворотка к Шигеллам флекснера. При положительной реакции агглютинации со смесью выделенную культуру агглютинируют отдельно с каждой сывороткой, входящей в смесь.

Положительная реакция агглютинации с адсорбированной сывороткой к Шигеллам зонне или ньюкастл дает право дать ответ. Для установления типа и подтипа Шигелл флекснера необходимо дополнительно поставить агглютинацию с типовыми (I, II, III, IV, V) и групповыми (3,4 — 6 — 7,8) сыворотками.

Например, выделенная культура дала положительную реакцию с типовой сывороткой I и групповой сывороткой 3,4. Как видно из табл. 33, выделена культура Шигелл флекснера, подвид флекснер, тип I, подтип Iа.

Ответ — выделены Шигеллы флекснер Iа.

При отсутствии агглютинации со смесью № 1 ставят реакцию агглютинации с другими поливалентными сыворотками, содержащими антитела ко всем типам Шигелл дизентерии Лардж — Сакса (4—7), провизорным (8—10) и Бойда (1—6,7—10, 11—15). При наличии агглютинации выделенной культуры одной из этих сывороток проводят испытание этой культуры с каждой из сывороток, входящих в поливалентную. Положительный результат с одной из сывороток определяет тип выделенной культуры.

При постановке реакции агглютинации следует учитывать отношение изучаемой культуры к манниту и в зависимости от этого использовать ту или иную сыворотку. Так, маннитнегативные культуры (не расщепляющие маннита) испытывают с поливалентными сыворотками к Шигеллам Григорьева — Шига и Шмитца — Штуцера, Лардж — Сакса, провизорным типам, расщепляющие маннит — со смесью № 1 и поливалентными сыворотками к Шигеллам бойда. При использовании сыворотки к Шигеллам бойда агглютинацию начинают с сывороткой того типа, который более часто встречается в данной местности. В нашей стране чаще выделяют Шигеллы бойда типов 4, 5, 7, 9 и 12.

В качестве ускоренных методов микробиологического исследования при дизентерии применяют люминесцентную микроскопию и биологическую пробу на морских свинках.

При введении вирулентных штаммов шигелл в конъюнктивальный мешок (под нижнее веко) к концу первых суток у животных развивается конъюнктивит.

Контрольные вопросы

1. Какие культуры подвергают дальнейшему исследованию?
2. Расщепление какого углевода дает право дать отрицательный ответ?

3. При помощи каких сывороток можно установить вид, подвид и подтип шигелл?

4. При помощи каких сывороток можно установить подтип Шигелл флекснера?

5. Какие сыворотки входят в смесь № 1?

Задание. Заполните форму № 28.

Форма № 28

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования

Глава 15. ВОЗБУДИТЕЛИ КОКЛЮША И ПАРАКОКЛЮША

Семейство бруцеллацее, род Bordetella. Возбудитель коклюша — бактерии пертуссис — был описан в 1906 г. Борде, а паракоклюша — Бредфордом и Славиным в 1937 г. одновременно с Эльдерингом и Кендрик (бактерии парапертуссис).

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ БАКТЕРИЯМИ ПЕРТУССИС И ПАРАПЕРТУССИС

Коклюшные и паракоклюшные микробы вызывают острую инфекцию дыхательных путей с основным клиническим синдромом — конвульсивным кашлем и поражают главным образом детей дошкольного возраста.

Путь передачи воздушно-капельный. Ворота инфекции — слизистая оболочка носоглотки.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Бактерии коклюша — мелкие грамотрицательные палочки (0,3—0,5×1—1,5 мк) овоидной формы. Возбудители паракоклюша несколько больше (0,5—0,6×2 мк). Оба микроба неподвижны, не образуют спор. Молодые культуры иногда имеют капсулу. Образуют эндотоксин.

Культивирование

Бактерии пертуссис и парапертуссис являются факультативными аэробами. Растут при температуре 35—37° и pH среды 7,0—7,4. Бактерии коклюша не растут на простых питательных средах, для их выращивания применяют глицерино-картофельный агар или агар с кровью. В последнее время широко используют среду КУА — казеиново-угольный агар, в котором гидролизат казеина является источником аминокислот, необходимых для роста возбудителей коклюша. Бактерии паракоклюша несколько менее требовательны к питательным средам, растут, хотя и скудно, на МПА и МПБ, оптимальными средами для них также являются среда Борде — Жангу и КУА.

На среде КУА оба микроба растут в виде мелких (1 мм в диаметре), блестящих куполообразных колоний, похожих на капельки ртути. Колонии вязкой, сметанообразной консистенции. Колонии бактерий парапертуссис несколько крупнее, они окрашивают среду КУА и МПА с 0,1% тирозина в коричневый цвет, так как содержат фермент тирозиназу. Это является дифференциально-диагностическим признаком. Возбудители коклюша этого фермента не имеют и цвет среды не изменяют.

На кровяном бульоне бактерии коклюша и паракоклюша образуют равномерную муть и придонный осадок. Оба микроба растут медленно: возбудитель коклюша вырастает на 3—5-й день, паракоклюша — на 2—3-й день.

Биохимические свойства

Микробы коклюша малоактивны: не расщепляют углеводов, не ферментируют белки. Бактерии паракоклюша более активны, содержат ферменты уреазу и тирозиназу.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Бактерии коклюша и паракоклюша малоустойчивы. При температуре 56° эти микроорганизмы погибают через 20—30 минут. Низкая температура губительно действует на возбудителей коклюша и паракоклюша. Прямой солнечный свет убивает их через 1—2 часа, ультрафиолетовые лучи — через несколько минут. В высушенной мокроте эти микробы сохраняются несколько часов. Обычные

растворы дезинфицирующих веществ — 3% раствор хлорамина, сулема (1 : 1000) — быстро убивают бактерии пертуссис и парапертуссис. Оба микроба малочувствительны к антибиотикам, в том числе и к пенициллину.

Контрольные вопросы

1. Какое заболевание вызывают бактерии коклюша и паракоклюша?
2. Каковы пути передачи и ворота инфекции?
3. Какую форму имеют бактерии коклюша и паракоклюша и чем они отличаются друг от друга?
4. На каких средах они растут?
5. В какой цвет окрашивается питательная среда КУА при росте паракоклюшной палочки?

Задание. 1. Возьмите у преподавателя чашку с культурой бактерий коклюша и паракоклюша, сделайте два мазка и окрасьте их по Граму. Изучите под микроскопом, зарисуйте и покажите преподавателю. 2. Заполните форму № 29, указав характер роста, биохимические свойства и устойчивость возбудителя к физическим и химическим факторам.

Форма № 29

Возбудитель	Среда				Биохимические свойства		Устойчивость к физическим и химическим факторам				
							температура				
	МПА	МПБ	БОРДЕ—ЖАНГУ	КУА	проба на уреазу	образование пигмента	56°	0°	3% фенол	1:1000 сулема	антибиотики
Коклюша											
Паракоклюша											

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования — выделение возбудителей коклюша и паракоклюша.

Существует 3 основных метода сбора материала:

1) кашлевыми пластинками,
2) заглоточным тампоном,
3) носоглоточным тампоном.

Характер материала	Способы сбора материала
Слизь из носоглотки	**Метод кашлевых пластинок.** В момент появления кашля открытую чашку Петри с питательной средой подносят ко рту ребенка (на расстоянии 8—10 см) и держат несколько секунд на протяжении нескольких кашлевых толчков (рис. 30). Затем чашку закрывают и ставят в термостат.*

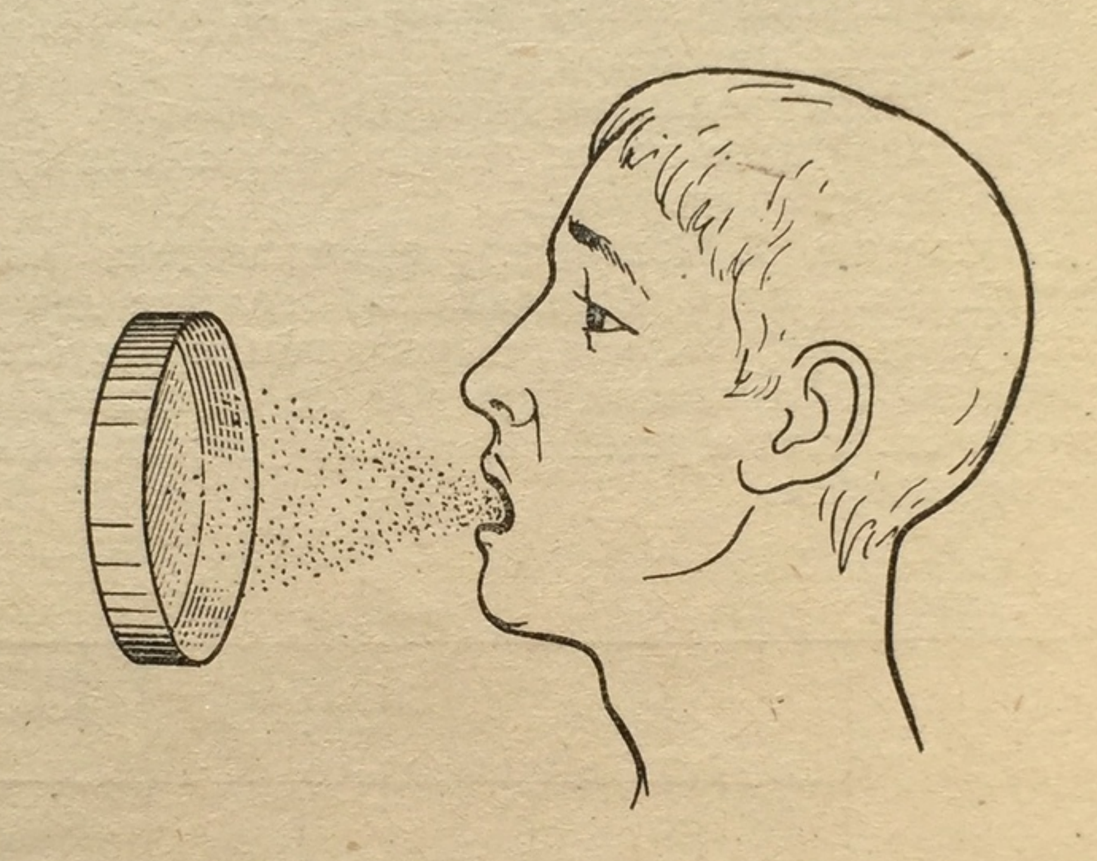


Рис. 30. Забор материала методом кашлевых пластинок.

Сбор материала заглоточным тампоном. Для приготовления тампона кусочек ваты плотно накручивают на конец проволоки, желательно нихромовой. Тампон помещают в пробирку (рис. 31) и стерилизуют. Перед сбором материала тампон вынимают из пробирки, сгибают о край пробирки под углом 120°.**

*Примечание. Снятую с чашки Петри крышку держат внутренней поверхностью книзу.

**Примечание. Следует проследить, чтобы тампон плотно прилегал к проволоке и был гладким.

Характер материала	Способы сбора материала

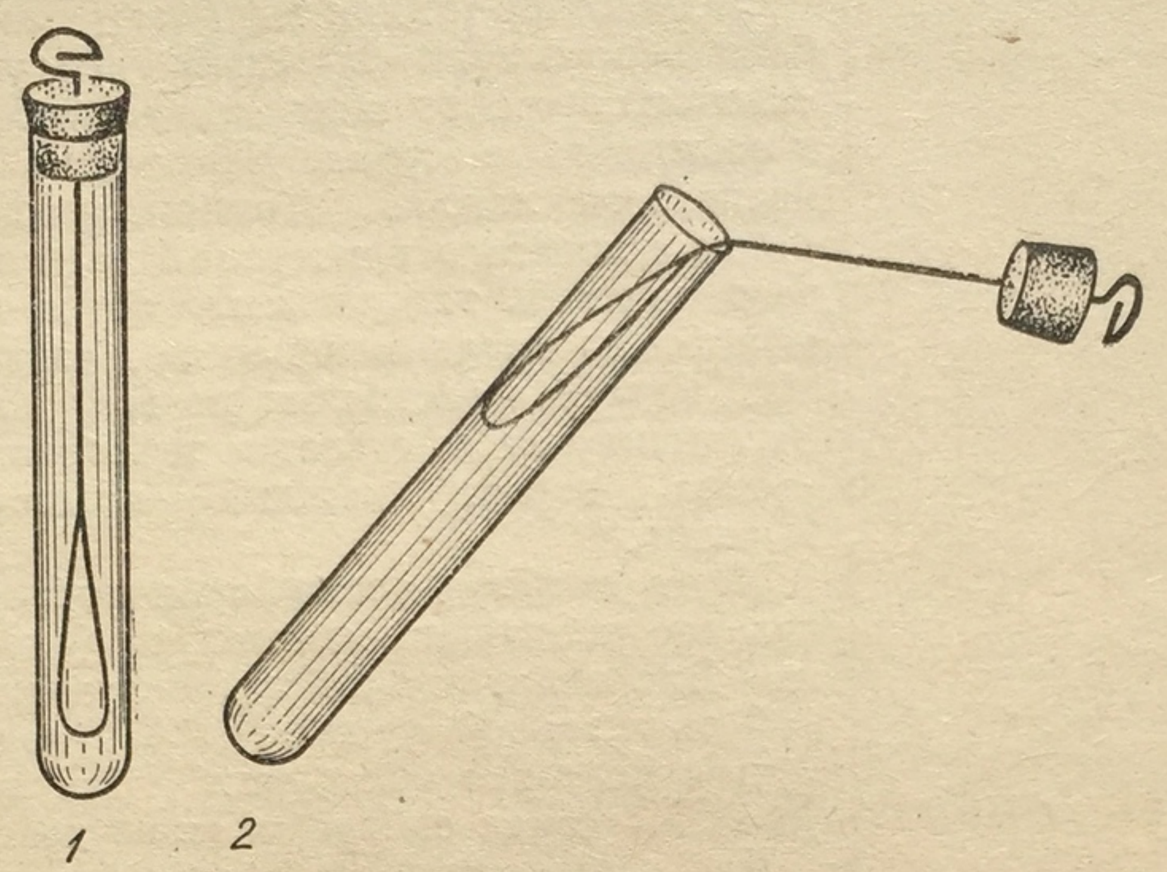


Рис. 31. Тампон для взятия материала из заднеглоточной области.

1 — пробирка с тампоном; *2* — тампон изогнут о край пробирки под углом 110 — 120°.

Ребенку предлагают открыть рот, стерильным шпателем надавливают на корень языка и вводят тампон в полость рта до тех пор, пока конец его не прикоснется к задней стенке глотки (ощущение провала).* При этом у ребенка появляется кашлевой рефлекс, который сопровождается выделением слизи. Затем тампон осторожно вынимают и делают посев на поверхности среды в чашках Петри; сначала несколько штрихов, а затем растирают материал по всей поверхности среды. Засеянные чашки ставят в термостат. **

Забор материала носоглоточным тампоном. Голова ребенка должна быть фиксирована в руках помощника.***

Примечание.* Тампон не должен касаться слизистой оболочки языка и щек.

** Сбор материала производят натощак, до приема пищи и лекарств.

*** Ватный тампон для сбора материала из носоглотки должен быть приготовлен из эластичной нихромовой проволоки.

Продолжение

Характер материала	Способы сбора материала
	Стерильный тампон вынимают из пробирки и сгибают его о край пробирки под углом 120°, затем осторожно вводят через ноздрю ребенка в носоглотку и забирают материал. При этом у ребенка иногда начинается кашель. Тампон лучше не удалять до конца кашлевого приступа. После окончания кашлевого приступа тампон вынимают и делают несколько штрихов на питательной среде в чашках Петри, после чего материал растирают по всей поверхности среды. Засеянные чашки ставят в термостат. Независимо от метода забора каждый посев производят на 2 чашки.* При необходимости транспортировать чашки на далекое расстояние используют **увлажненные тампоны**. Для этого ватный тампон увлажняют растопленной питательной средой (КУА), дают среде подсохнуть и повторно увлажняют. Так проделывают три раза. Материал собирают вышеуказанным способом. Для угнетения роста сопутствующей грамположительной флоры (из носоглотки) к питательной среде прибавляют пенициллин из расчета 7,5 ЕД (в 0,1 мл раствора) на 20 мл среды (1 чашка). Среду растапливают, охлаждают до температуры 45—50°, добавляют пенициллин и разливают в чашки.

*Примечание. Если сделанные посевы подлежат транспортировке в зимнее время, чашки заворачивают в вату для предохранения от холода.

Контрольные вопросы

1. Что служит материалом для исследования при подозрении на коклюш?
2. Перечислите методы сбора материала при подозрении на коклюш?
3. На каком расстоянии от рта устанавливают чашку со средой при методике кашлевых пластинок?
4. Что прибавляют к среде для подавления роста грамположительной флоры?
5. В какой концентрации прибавляют пенициллин к питательной среде?

Задание. 1. Возьмите 10 чашек со средой КУА, флакон пенициллина, содержащий 300 000 ЕД. Сделайте разведение пенициллина таким образом, чтобы в 0,1 мл содержалось 7,5 ЕД. Сделайте расчет на общее количество среды.

2. Соберите отделяемое носоглотки друг у друга заглоточным тампоном.

Внимание! При взятии материала не касайтесь тампоном языка и щек.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основной метод исследования — микробиологический

Характер материала	Методика исследования
Слизь из носоглотки	**Первый день исследования** Производят сбор материала (стр. 204—206) и посев на питательные среды, которые ставят в термостат на 4—5 дней. Для предохранения сред от высыхания в термостат ставят открытый сосуд с водой. **Второй день исследования** Просматривают чашки Петри с посевами, пользуясь стереоскопическим бинокулярным микроскопом, изучают характер выросших колоний. Обычно одних суток инкубации в термостате недостаточно для роста коклюшных бактерий. **Третий день исследования** Посевы вынимают из термостата и просматривают, пользуясь лупой или стереоскопическим бинокулярным микроскопом. При наличии подозрительных колоний их выделяют на казеиново-угольный агар (КУА) в пробирках или чашках Петри, разделенных на секторы. Посевы ставят в термостат. Если колоний много, из части их можно сделать мазки, покрасить их и просмотреть под микроскопом. При наличии мелких грамотрицательных палочек ставят пробную агглютинацию с диагностическими сыворотками к возбудителям коклюша и паракоклюша, взятыми в разведении 1:10. Реакцию ставят на предметном стекле. Положительный результат реакции агглютинации позволяет дать предварительный ответ. **Четвертый день исследования** Посевы вынимают из термостата. Просматривают первичные посевы в пробирках или на чашках с КУА. Сначала просматривают невооруженным глазом, обращая внимание на цвет среды (нет ли коричневого окрашивания), затем изучают рост при помощи стереоскопического микроскопа. При наличии подозрительных колоний в выделенной культуре делают мазки, окрашивают их по Граму и изучают под микроскопом. Затем ставят реакцию агглютинации на стекле с диагностическими коклюшными или паракоклюшными сыворотками в разведении 1:10.

Продолжение

Характер материала	Методика исследования
	Для окончательной идентификации культуры при положительной реакции агглютинации ставят пробу на наличие уреазы и производят посев на скошенный агар, содержащий 0,1% тирозина. **Проба на уреазу**. В маленькую пробирку наливают 0,3—0,4 мл 2% раствора мочевины, вносят петлю культуры и добавляют 2—3 капли фенолфталеина. Пробирку встряхивают и ставят в термостат. Учитывают реакцию через 2 и 24 часа. Бактерии коклюша не изменяют цвет среды. Бактерии паракоклюша обладают ферментом уреазой, который расщепляет мочевину с образованием аммиака. Аммиак изменяет индикатор и среда окрашивается в красный цвет. **Проба с тирозином**. На скошенный агар (МПА) в пробирках с 0,1% тирозина засевают выделенную культуру и ставят в термостат. На следующий день вынимают пробирку из термостата и просматривают ее. Наличие роста в пробирке и окрашивание среды в коричневый цвет свидетельствуют о выделении возбудителей паракоклюша. Бактерии коклюша на этой среде не растут. Пятый день исследования При отсутствии подозрительных колоний дают отрицательный ответ.

Задание. 1. Возьмите у преподавателя чашку с культурой бактерий коклюша или паракоклюша, изучите характер колоний с помощью стереоскопического микроскопа. Подозрительные колонии посейте на сектор среды КУА (выделение чистой культуры).

2. Возьмите у преподавателя чистую культуру бактерий коклюша или паракоклюша, выросшую на секторе среды КУА, и поставьте реакцию агглютинации с диагностической коклюшной сывороткой. Сыворотку разведите в 10 раз.

Внимание! При постановке реакции агглютинации не забудьте поставить контроль с физиологическим раствором.

3. При наличии положительной реакции агглютинации поставьте пробу на уреазу и сделайте посев на среду с тирозином (0,1%).

4. Заполните форму № 30, схему поэтапного исследования на коклюш или паракоклюш.

Через 48 часов (третий день)	Через 72 часа (четвертый день)

Примечание. При росте бактерий в более поздние сроки исследование также проводят указанным выше методом.

Ускоренная диагностика

При бактериологическом методе исследования ответ можно получить не раньше 3—4-го дня.

Применение люминесцентной микроскопии (при помощи люминесцирующих сывороток) позволяет дать ответ через несколько часов после взятия материала.

Питательные среды

Казеиново-угольный агар (КУА). К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 20 мл гидролизата казеина, 5 г хлористого натрия, 0,2 г хлористого калия, 0,002 г хлористого кальция, 0,4 г углекислого натрия, 0,025 г хлористого магния, 0,24 г фосфорнодвукалиевой соли, 1 г крахмала растворимого, 0,01 г цистина и 20 г агара.

После приготовления среды устанавливают pH 7,2, среду разливают по бутылям, стерилизуют в автоклаве под давлением 0,5 атм в течение 30 минут.

Перед употреблением в растопленный и остуженный до температуры 50° агар добавляют 3% дрожжевого экстракта и 0,2% сухого активированного угля (стерилизованного в автоклаве).

Приготовление дрожжевого экстракта. 1000 г прессованных дрожжей размельчают и смешивают с 825 мл дистиллированной воды. Взвесь нагревают до температуры 90—92° и сразу же фильтруют через складчатый бумажный фильтр, а затем через фильтр Зейтца.

Для проверки на стерильность 2—3 мл дрожжевого экстракта засевают в 10 мл сахарного мясо-пептонного

бульона и выдерживают 3 суток при температуре 28—30°. Дрожжевой экстракт готовят впрок и хранят в холодном месте.

Глава 16. ВОЗБУДИТЕЛИ ДИФТЕРИИ

Семейство коринебактерий, род Corynebacterium. Возбудители дифтерии открыты в 1883 г., а в 1884 г. описаны Леффлером и названы его именем.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ДИФТЕРИИ

1. Дифтерия зева.
2. Дифтерия носа.
3. Дифтерия глаза.
4. Дифтерия уха.
5. Дифтерия влагалища.
6. Дифтерия раневой поверхности.

МОРФОЛОГИЯ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Возбудители дифтерии — это слегка изогнутые палочки с булавовидным утолщением на концах, размер их 3—6×0,3—0,6 мк. На концах палочек расположены зерна волютина (Бабеш — Эрнста). Палочки неподвижны, не образуют спор и капсул. Образуют эндотоксин. Микробная клетка окрашивается неравномерно даже при простом методе окраски: метиленовым синим, генцианфиолетовым и др.; зерна окрашиваются более интенсивно, чем цитоплазма. При окраске по методу Нейссера (сложная окраска) клеточное содержимое окрашивается в желтый цвет, а зерна волютина — в синий. Особенностью бактерий дифтерии является полиморфизм: в одной культуре встречаются различные по размеру палочки, которые располагаются попарно под острым углом в виде растопыренных пальцев (римской цифры V), образуют крест (X) и скопления в виде войлока (см. рис. I—II—2).

Расположение бактерий дифтерии в мазках и наличие зерен волютина на обоих концах палочек являются важным дифференциальным признаком при микроскопическом исследовании, так как непатогенные представители рода коринебактерий — дифтероиды и ложнодифтерийная

палочка — располагаются обычно в виде частокола, зерна волютина находятся у них на одном конце палочки, а иногда отсутствуют.

Культивирование

Бактерии дифтерии — факультативные аэробы. Растут при температуре 35—37°, pH среды 7,2—7,6; оптимальными для их развития являются среды, содержащие белок (кровь, сыворотка). Основной для выращивания возбудителей дифтерии является среда **Клауберга,** содержащая дефибринированную кровь и теллурит калия (стр. 220).

На основании культуральных и биохимических свойств бактерии дифтерии делят на три типа. Первый тип гравис (gravis), колонии бактерий этого типа находятся в R-форме (шероховатой), второй тип митис (mitis), растет в виде колоний в S-форме (гладких); третий тип интермедиус (intermedius): встречаются в колонии в обеих формах — S и R (гладкие и шероховатые).

На среде Клауберга бактерии типа гравис растут в виде довольно крупных шероховатых колоний серого или черного цвета (розетки); на бульоне образуют пленки и золотистый осадок.

Коринебактерии дифтерии типа митис на среде Клауберга образуют небольшие гладкие колонии черного цвета; на бульоне дают равномерную муть.

Коринебактерии дифтерии типа интермедиус на среде Клауберга растут в виде мелких плоских колоний, с более темным центром, иногда с неровными краями. Дают равномерное помутнение бульона и зернистый осадок.

На свернутой сыворотке или агаре с 10% сыворотки все три типа бактерий дифтерии развиваются в течение 14—18 часов, образуя небольшие желтоватые, не сливающиеся колонии, напоминающие шагреневую кожу.

Биохимические свойства

Возбудители дифтерии всех трех типов расщепляют глюкозу, не расщепляют сахарозу и маннит. Бактерии дифтерии типа гравис расщепляют крахмал, что является признаком, отличающим их от бактерий дифтерии двух других типов. Возбудители дифтерии не створаживают

молока, не разлагают мочевины, не расщепляют питательный субстрат, содержащий пептон, до индола. Иногда происходит расщепление питательной среды с образованием сероводорода. Не содержат уреазы, обладают цистиназой. Последнее свойство используют для дифференциации возбудителей дифтерии от непатогенных представителей рода коринебактерий.

Контрольные вопросы

1. Какие заболевания вызывают бактерии дифтерии?
2. Где локализуются возбудители дифтерии?
3. Какой путь передачи инфекции?
4. Назовите ворота инфекции при дифтерии.
5. Опишите морфологию бактерий дифтерии.
6. Перечислите типы бактерий дифтерии.
7. Какова форма колоний возбудителей дифтерии типа гравис, митис и интермедиус?
8. На каких средах выращивают бактерии дифтерии?
9. Какова биохимическая активность бактерий дифтерии?
10. Отношение к какому углеводу позволяет отличить бактерии типа гравис от двух других типов?

Задание. Возьмите у преподавателя два фиксированных мазка с культурой бактерий дифтерии, окрасьте их двумя способами: простым — синью Леффлера и сложным — по Нейссеру, изучите их под микроскопом, зарисуйте и покажите преподавателю.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИЗИЧЕСКИМ И ХИМИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Температура 60° убивает возбудителей дифтерии в течение 10 минут, кипячение — в течение минуты. Если бактерии дифтерии находятся в пленке, образующейся на пораженных процессом участках, они могут выдержать нагревание до 90°. Низкие температуры они переносят хорошо. К высушиванию возбудители дифтерии довольно устойчивы. Дезинфицирующие вещества (3% раствор фенола, 1% сулема, 10% перекись водорода) убивают эти микроорганизмы в течение нескольких минут.

Дифтерийный экзотоксин малоустойчив. При воздействии на токсин формалина и температуры он превращается в безвредный, но иммуногенный анатоксин, который значительно устойчивее токсина.

Задание. Заполните форму № 31, указав характер роста, биохимические свойства возбудителей дифтерии и отношение их к физическим и химическим факторам.

Форма № 31

Типы бактерий дифтерии	Среда		Биохимические свойства			Отношение к физическим и химическим факторам				
	Клауберга	свернутая сыворотка	глюкоза	сахароза	крахмал	3% фенол	1% сулема	температура		высушивание
								60°	—30°	
Гравис										
Митис										
Интермедиус										

Материал для исследования зависит от локализации процесса:

1) отделяемое слизистой оболочки зева,
2) отделяемое слизистой оболочки носа,
3) отделяемое слизистой оболочки глаза,
4) гной из уха,
5) отделяемое слизистой оболочки влагалища,
6) отделяемое раны.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Цель исследования: выделение возбудителя для постановки диагноза; выявление бактерионосителей дифтерии с профилактической целью и по эпидемическим показаниям.

При любой локализации процесса материал собирают ватным тампоном; для тампона используют металлическую проволоку, желательно алюминиевую. На один конец проволоки плотно накручивают вату, затем тампон монтируют в корковую пробку, помещают в пробирку и стерилизуют в печи Пастера при температуре 160° в течение часа или 30 минут в автоклаве при температуре 112°.

Характер материала	Способ сбора материала
Слизь из зева*	Слизь собирают тампоном на границе пораженного участка и здоровой слизистой оболочки.
Слизь из носа	Слизь из обеих ноздрей можно брать одним тампоном.**
Слизь из глаза	Собирают тампоном.
Гной из уха	Собирают тампоном, смоченным в физиологическом растворе.
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	Собирают тампоном.
Отделяемое раны	Собирают тампоном.***

* Примечание. Материал собирают натощак либо не раньше чем через 2 часа после еды.

** Если материал берут из зева и носа, то пробирки с обоими тампонами надписывают и связывают вместе. Посевы делают раздельно и исследование каждого ведут как самостоятельный анализ.

*** Материал, собранный сухим тампоном, должен быть посеян не позднее чем через 2—3 часа после забора. При необходимости транспортировать собранный материал тампон предварительно смачивают 5% раствором глицерина в физиологическом растворе.

Контрольные вопросы

1. Какой материал служит для исследования?
2. Как следует собирать материал из зева и как из носа?
3. Когда нужно засеять материал, собранный сухим тампоном?
4. Что нужно сделать с тампоном, если собранный материал необходимо транспортировать?

Задание. 1. Возьмите у преподавателя проволоку и вату и приготовьте 10 тампонов, вмонтируйте их в корковую пробку, вставьте в пробирку и простерилизуйте.

Внимание! Перед стерилизацией проверьте, достаточно ли плотно накручен тампон.

2. Возьмите у преподавателя стерильные тампоны и произведите сбор материала друг у друга из зева и носа (разными тампонами).

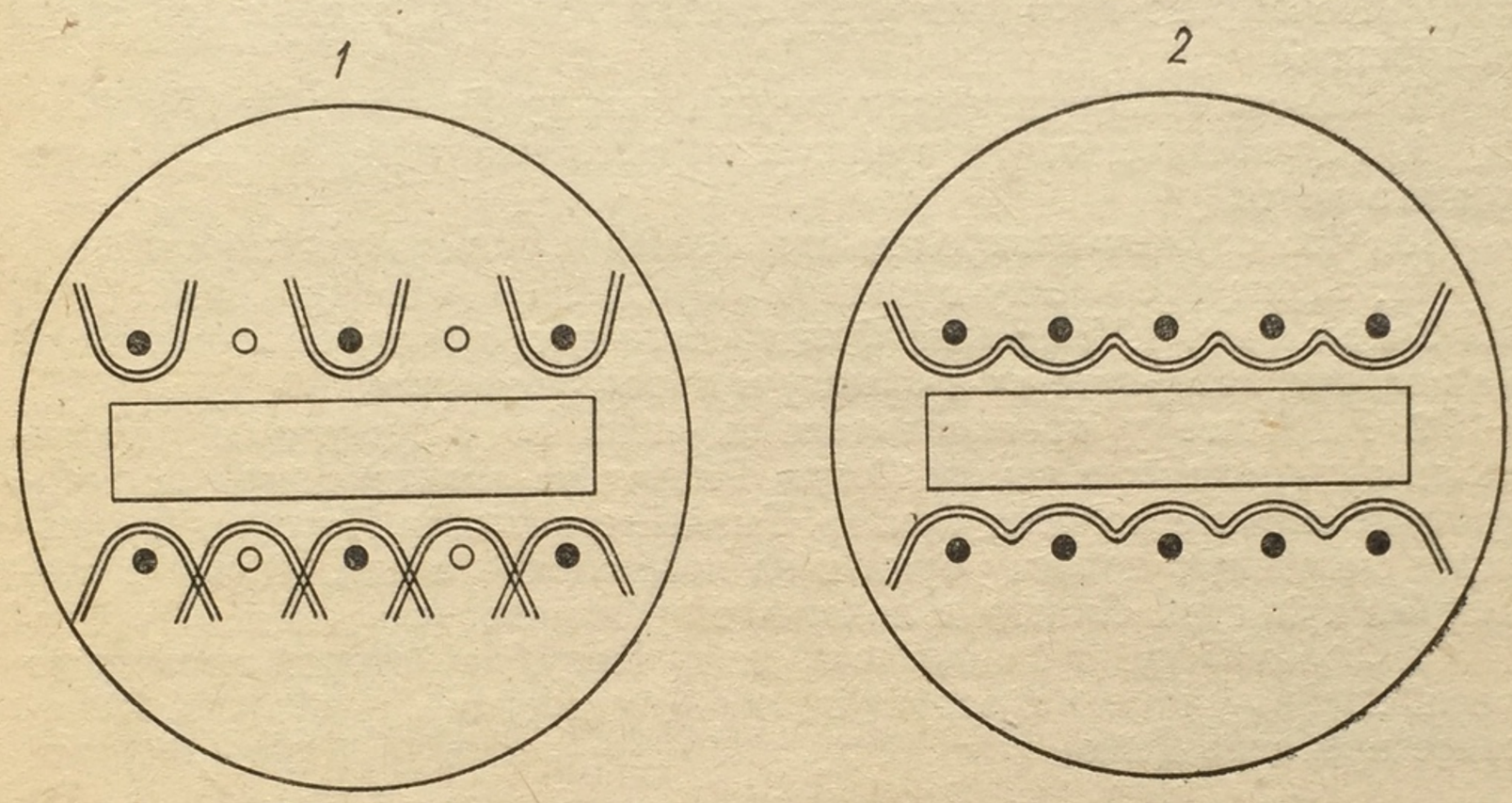
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Основной метод исследования — микробиологический

Характер материала	Методика исследования
(см. предыдущую схему)	**Первый день исследования** Предварительную микроскопию мазка, сделанного тампоном, производят только по требованию лечащего врача. В этом случае нужно сделать мазки из слизи носа и зева, взятой разными тампонами. При наличии в мазке палочек с характерной для возбудителей дифтерии морфологией можно дать предварительный ответ. Посев производят на среду Клауберга, разлитую в чашки Петри. Тампоном втирают исследуемый материал в среду, поворачивая тампон, сначала на ограниченном участке, затем штрихами по всей поверхности отведенного для посева участка. При посевах материала, собранного для постановки диагноза, засевают всю чашку или $^1/_2$ часть; при посевах, проводимых с профилактической целью, засевают $^1/_3$ или $^1/_4$ чашки. Посевы ставят в термостат. **Второй день исследования** Чашки вынимают из термостата и просматривают. Так как рост бактерий дифтерии на среде Клауберга замедлен (присутствие ингибиторов), величина колоний обычно недостаточна и поэтому чашки оставляют в термостате до следующего дня (48 часов). **Третий день исследования** Чашки вынимают из термостата и просматривают их при помощи лупы или стереоскопического микроскопа. При наличии подозрительных колоний (см. стр. 211) их под контролем стереоскопического микроскопа выделяют на свернутую сыворотку, агар с 10% сыворотки или на сектор среды Клауберга в чашках Петри. Мазки для микроскопического исследования со среды Клауберга не делают, так как на этой среде бактерии теряют зернистость, изменяют длину и т. д. При посеве на среды с сывороткой морфологическая специфичность возбудителей дифтерии восстанавливается. При наличии большого количества подозрительных колоний выделяют 1—2 изолированные колонии и

Характер материала	Методика исследования
	часть каждой засевают на 3 среды: свернутую сыворотку (или агар с 10% сыворотки), столбик среды Пизу для определения фермента цистиназы и на поверхность агара в чашках Петри «бляшками» для определения токсигенности. Проба на наличие фермента цистиназы и определение токсигенности являются обязательными при идентификации возбудителей дифтерии. Если результат этих опытов, проведенных с частью колоний со среды Клауберга, недостаточно четкий или отрицательный, то опыт повторяют, используя выделенную чистую культуру. **Пробу на присутствие цистиназы** проводят путем посева исследуемой культуры уколом в центр столбика среды Пизу (см. стр. 221). При положительной реакции через 18—24 часа по ходу укола наблюдается почернение, а вокруг черного стержня образуется темное облачко; почернение происходит в результате того, что фермент цистиназа расщепляет цистин, входящий в состав среды Пизу, и освободившаяся сера вступает в реакцию с уксуснокислым свинцом — образуется сернистый свинец черного цвета. Дифтероиды и ложнодифтерийные палочки не обладают ферментом цистиназой, поэтому при росте их на среде Пизу цвет среды не изменяется. **Определение экзотоксина** проводят методом диффузионной преципитации в геле. Метод основан на взаимодействии токсина с антитоксином. В тех участках агара, где эти компоненты взаимодействуют, образуется преципитат в виде линий, называемых усами. Методика определения: в чашки Петри разливают агар, обычно агар Мартена, так как на этой среде токсинообразование происходит более интенсивно. Количество агара должно быть не больше 12—15 мл (в большем слое линии преципитации плохо видны). После застывания агара накладывают полоску стерильной фильтровальной бумаги, смоченной противодифтерийной антитоксической сывороткой. Испытуемую культуру засевают «бляшками». Посев производят петлей. Величина бляшек 0,8—1 см в диаметре. Расстояние бляшек от края полосок бумаги 0,5—0,7 см, между двумя бляшками испытуемой культуры засевают бляшки заведомо токсигенного штамма. Испытуемую культуру считают **токсигенной**, если линии преципитации четкие и сливаются с линиями преципитации контрольного (токси-

Характер материала	Методика исследования
	генного) штамма. Если линии преципитации перекрещиваются с линиями контрольного штамма или вообще отсутствуют, выделенную культуру считают нетоксигенной (рис. 32).



● Токсигенная культура ○ Исследуемая культура

Рис. 32. Выявление экзотоксина в реакции диффузной преципитации в агаре.

1 — бляшки нетоксигенного штамма (линии преципитации перекрещиваются); *2* — бляшки токсигенного штамма (линии преципитации соединяются).

Приготовление полосок бумаги

Из фильтровальной бумаги нарезают полоски размером 1,5×8 см, заворачивают по несколько штук в бумагу и стерилизуют в автоклаве при температуре 120° в течение 20 минут. Перед постановкой опыта стерильным пинцетом вынимают одну полоску, укладывают ее в стерильную чашку Петри и смачивают противодифтерийной антитоксической сывороткой. Предварительно сыворотку разводят так, чтобы в 1 мл содержалось 500 АЕ (антитоксических единиц). Бумажку смачивают 0,25 мл сыворотки (125 АЕ) и помещают на поверхность среды. Затем делают бляшки указанным выше способом.

Все посевы ставят в термостат.

Контрольные вопросы

1. В каких случаях делают мазки непосредственно тампоном?
2. Как производят посев на среду Клауберга?
3. Какую часть среды засевают при исследованиях, проводимых с диагностической целью, и какую при профилактических?
4. При помощи какого прибора изучают колонии на среде Клауберга?
5. Через сколько времени роста на среде Клауберга колонии хорошо дифференцируются?
6. На какую среду пересевают колонии для выделения чистой культуры?
7. Почему не проводят микроскопии колоний, взятых со среды Клауберга?
8. Какова цель и методика постановки пробы на среде Пизу?
9. Расскажите, в чем принцип определения токсигенности и каков его метод?
10. Что служит контролем при исследовании токсигенности?
11. Зарисуйте чашку с опытом определения токсигенности.

Задание. 1. Возьмите фильтровальную бумагу и нарежьте ее на полоски, заверните их в бумагу и простерилизуйте.

2. Возьмите у преподавателя пакетик со стерильными бумажками, положите их в чашку Петри. Разведите антитоксическую сыворотку и смочите полоски бумаги. Разлейте в чашки Петри агар, уложите смоченную полоску бумаги на поверхность агара, сделайте петлей без культуры бляшки и покажите преподавателю.

3. Возьмите у преподавателя среду Пизу, на которой произошло расщепление цистина и зарисуйте черный стержень и облачко. Покажите преподавателю.

Продолжение

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (СХЕМА)

Характер материала	Определение биохимических свойств и токсигенности
	Четвертый день исследования
Выделенная культура дифтерии	Вынимают посевы из термостата, учитывают результат. Наличие в мазках характерных по морфологии палочек, черного с облачком стержня в среде Пизу и линий преципитации в агаре позволяет дать ответ: обнаружены бактерии дифтерии. Исследование продолжают. При отсутствии линий преципитации в агаре или их недостаточной четкости исследование на токсигенность обязательно повторяют с выделенной чистой культурой. Для окончательной идентификации выделенной культуры и определения **типа** возбудителя производят посев на среды Гисса (глюкозу, сахарозу и крахмал) и ставят дополнительно пробу на уреазу.

Характер материала	Определение биохимических свойств и токсигенности
	Посев на среды Гисса делают обычным способом. Пробу на уреазу проводят следующим образом: выделенную культуру засевают на бульон с мочевиной и индикатором (крезолрот) и ставят в термостат. Уже через 30—40 минут можно учитывать результат: при посеве истинных возбудителей дифтерии цвет среды не изменяется, так как они **не обладают уреазой**. Ложнодифтерийная палочка и дифтероиды расщепляют мочевину и изменяют индикатор, поэтому среда приобретает малиново-красный цвет. Для подтверждения принадлежности выделенной культуры к роду коринебактерий ставят реакцию агглютинации с политиповой агглютинирующей сывороткой (табл. 35).

Таблица 35

Свойства возбудителей дифтерии и близких к ним коринебактерий

Коринебактерии	Токсигенность	Цистиназа	Сахароза	Глюкоза	Крахмал	Уреаза	Результат реакции агглютинации с политиповой сывороткой
Возбудители дифтерии — типы:							
гравис	+	+	—	+	+	—	+
митис	+	+	—	+	—	—	+
интермедиус	+	+	—	+	—	—	+
Дифтероиды	—	—	±	+	—	+	—
Ложнодифтерийная палочка	—	—	—	—	—	+	—

Контрольные вопросы

1. Какие исследования производят для окончательной идентификации выделенной культуры?
2. Какая проба является дополнительной и на чем она основана?

Продолжение

Характер материала	Определение биохимических свойств и токсигенности
	Пятый день исследования Учитывают результаты посева на среды Гисса Учитывают результаты определения токсигенности чистой культуры (если результаты исследования смешанной культуры были неясными или отрицательными). Выписывают окончательный ответ, обязательно отмечая токсигенность выделенной культуры

Задание. 1. Изучите по табл. 35 свойства возбудителей дифтерии и близких к ним коринебактерий.

2. Возьмите у преподавателя культуру ложнодифтерийных палочек и поставьте пробу на наличие уреазы.

3. Заполните форму № 32, указав этапы исследования, проводимого с целью выделения возбудителей дифтерии.

Форма № 32

Первый день исследования	Второй день исследования	Третий день исследования	Четвертый день исследования	Пятый день исследования

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Теллуровая среда Клауберга. Первая смесь. Предварительно, за $1^1/_2$ месяца, готовят смесь из 20 мл бараньей или лошадиной крови и 10 мл химически чистого глицерина. В день приготовления среды готовят две другие смеси.

Вторая смесь. 50 мл мясо-пептонного агара (pH 7,5) растапливают и охлаждают до температуры 50°, после чего прибавляют 2,5 мл первой смеси.

Третья смесь. Смешивают 17 мл бараньей крови и 33 мл дистиллированной воды (смесь приготовляют стерильно) и подогревают в водяной бане до температуры 50°. Соединяют вторую и третью смеси, прибавляют 4 мл

1% раствора теллурита калия (K_2TeO_3), быстро все перемешивают и разливают в чашки. Среда прозрачная, имеет цвет красного вина.

Возбудители дифтерии, восстанавливающие соли теллура, растут на среде в виде круглых непрозрачных колоний черного цвета или с темно-серым центром. Ложнодифтерийная палочка образует мелкие непрозрачные колонии серого цвета с коричневым центром. Дифтероиды растут в виде выпуклых блестящих колоний серого цвета с черным центром.

Среда Пизу. К 90 мл расплавленного 2% мясо-пептонного агара (pH 7,6) добавляют 2 мл раствора цистина (1% раствор цистина в 0,1 н. растворе NaOH), тщательно перемешивают и добавляют такой же объем 0,1 н. раствора серной кислоты. Среду стерилизуют 30 минут при температуре 112°. К расплавленной и охлажденной до 50° среде добавляют 1 мл 10% раствора уксуснокислого свинца (стерилизованного двукратно текучим паром), перемешивают и добавляют 9 мл нормальной лошадиной сыворотки. Среду стерильно разливают по маленьким пробиркам по 2 мл. Посев производят уколом.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Глава 1. Бактериологическая лаборатория. *Садыков А. И., Черкес Ф. К.* 3
Глава 2. Классификация микроорганизмов и методы изучения их морфологии. *Фадеева Г. В.* 9
Глава 3. Стерилизация. *Бельская Н. А.* 28
Глава 4. Микробиологические методы исследования. *Кац Г. И.* 43
Глава 5. Серологические методы исследования (реакции иммунитета). *Кац Г. И.* 69
Глава 6. Биологические методы исследования (работа с животными). *Черкес Ф. К.* 95

ЧАСТЬ II. ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Патогенные кокки

Глава 7. Стафилококки. *Черкес Ф. К.* 115
Глава 8. Стрептококки. *Черкес Ф. К.* 126
Глава 9. Пневмококки. *Черкес Ф. К.* 135
Глава 10. Менингококки. *Черкес Ф. К.* 144
Глава 11. Гонококки. *Черкес Ф. К.* 154

Возбудители кишечных инфекций

Глава 12. Энтеропатогенные серотипы кишечных палочек. *Черкес Ф. К.* 161
Глава 13. Сальмонеллы. *Черкес Ф. К.* 171
Глава 14. Шигеллы. *Черкес Ф. К.* 190
Глава 15. Возбудители коклюша и паракоклюша. *Черкес Ф. К., Шерстинская С. М.* 201
Глава 16. Возбудители дифтерии. *Черкес Ф. К., Шерстинская С. М.* 210

К сведению читателей!

Из плана выпуска литературы издательства «Медицина» на 1975 год:

Военно-медицинская подготовка. Под ред. Д. Д. КУВШИНСКОГО. Изд. 2-е, перераб. и доп. М. «Медицина», 1975 (I кв.), 26 л., с ил., 100 000 экз., 90 к.

В учебнике изложены задачи и основы организации медицинской службы Советской Армии, основы организации лечебно-профилактических мероприятий в мирное и военное время, а также формы и методы организации медицинского обеспечения части.

В соответствующих разделах рассмотрены основы военно-полевой хирургии и терапии, принципы оказания и организации медицинской помощи раненым и больным и их лечения в медицинских подразделениях и частях. Изложены основные положения санитарно-гигиенического и противоэпидемического обеспечения личного состава войск, содержание и особенности работы военного фельдшера в условиях эпидемической обстановки.

Учебник написан в соответствии с программой, утвержденной Министерством здравоохранения СССР, и предназначен для учащихся медицинских и фармацевтических училищ. План 1975 г.

Книги издательства «Медицина» поступают для продажи в специализированные книжные магазины и магазины, имеющие отделы медицинской литературы.

Черкес Фрида Карловна

РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Редактор *Л. Б. Богоявленская*
Художественный редактор *О. А. Четверикова*
Корректор *П. А. Сазыкина*
Техн. редактор *Л. Н. Вязьмина*
Обложка художника *А. Шкловской*

Сдано в набор 16/V-1974 г. Подписано к печати 23/X 1974. Формат бумаги 84×108/32 печ. л. 7,0 печ. л. вкл. 0,25 (условных 12,18. л.) 11,30 уч.-изд. л. Бум. тип. № 3. Тираж 44 000 экз. Т-16420 МУ-22. Цена 30 коп. Издательство «Медицина». Москва, Петроверигский пер., 6/8
Заказ 366.

Ярославский полиграфкомбинат «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

30 коп.